

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1930

N° 25

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1930

PAR

JACQUES DEVOUASSOUX

Né le 26 Août 1906, à Châteauneuf-en-Thymerais (Eure-et-Loir)

De l'Action du Formol et de quelques autres substances antiseptiques pour la conservation des Sérums

APPLICATION AU DIAGNOSTIC

JURY :

	Président : M. LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine.	
Assesseurs	M. PANISSET	Professeurs à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort,
	M. VERGE	

PARIS

IMPRIMERIE « LES PRESSES MODERNES »

45, rue de Maubeuge, Paris

1930

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1930

PAR

JACQUES DEVOUASSOUX

Né le 26 Août 1906, à Châteauneuf-eu-Thymerais (Eure-et-Loir)

De l'Action du Formol et de quelques autres substances antiseptiques pour la conservation des Sérums

APPLICATION AU DIAGNOSTIC

JURY :

Président :	M. LEMIERRE,	Professeur à la Faculté de Médecine
Assesseurs	M. PANISSET	Professeurs à l'Ecole Vétérinaire
	M. VERGE	d'Alfort,

PARIS

IMPRIMERIE « LES PRESSES MODERNES »

45, rue de Maubeuge, Paris

1930

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraire : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

Directeur : M. E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire
des Ecoles vétérinaires : P.-J. CADIOT, A. RAILLIET, H. VALLÉE.

PROFESSEURS ET CHARGÉS DE COURS

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques	BRESSOU.
Physiologie, thérapeutique générale.....	MAIGNON.
Physique et chimie médicales, toxicologie, pharmacie.....	NICOLAS.
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique; Zoologie.....	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique; sémiologie et propédeutique, jurisprudence.....	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, cli- nique : anatomie chirurgicale, médecine opératoire et fer- rure	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique; médecine opératoire, obstétrique.....	LESBOUYRIES
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique	PANISSET.
Histologie et embryologie anatomie pathologique; autopsies.	PETIT.
Zootéchnie et économie rurale	DECHAMBRE.
Agronomie, botanique et hygiène; matière médicale.....	DECHAMBRE et HENRY.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale.....	VERGE.

PROFESSEURS AGRÉGÉS

MM. LESBOUYRIES — VERGE.

CHEF DE TRAVAUX AGRÉGÉ
M. SIMONNET.

CHEFS DE TRAVAUX
MM. MONVOISIN. — MOUSSU (R.)



La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opi-
nions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur
donner ni approbation, ni improbation.

A MA MÈRE

*Faible témoignage de ma profonde affection
et de ma grande reconnaissance
pour son admirable dévouement.*

A MON PÈRE

A MON FRÈRE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VALLÉE

A la haute autorité de qui nous avons eu recours pour nous conseiller durant nos études; nos plus vifs remerciements et l'expression de notre très respectueuse estime.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse; en hommage de notre respectueuse gratitude et reconnaissance pour le bienveillant accueil qu'il nous fit dans son laboratoire.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VERGE

Notre initiateur à la technique bactériologique. En témoignage de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMIERRE

*Pour le grand honneur qu'il nous a fait
en acceptant la présidence de cette
thèse.*

A MES MAITRES D'ALFORT

A MES CAMARADES

Avant-Propos

La pratique très répandue du séro diagnostic des maladies infectieuses des animaux, au moins de certaines d'entre elles comme l'avortement épizootique, la diarrhée blanche des poussins... se heurte à des difficultés d'application. La plus redoutable est celle qui résulte de la nécessité d'une récolte aseptique, surtout lorsqu'il s'agit d'opérer sur un très grand nombre d'animaux. Il en résulte, lorsque cette difficulté n'a pas été vaincue, une altération plus ou moins rapide ou complète du sang qui ne permet pas son utilisation, soit que le sérum obtenu soit teinté par la matière colorante du sang, soit que le sérum soit altéré par des souillures microbiennes.

Sur les conseils de M. le Professeur PANISSET, nous avons recherché un procédé qui permit dans les conditions ordinaires de la pratique, où la propreté est plus facile à réaliser que l'aseptie, d'obtenir un sérum abondant, clair, non teinté par l'hémoglobine, non altéré par la pullulation microbienne. Nous nous sommes arrêté à l'addition de substances antiseptiques.

Nous nous sommes proposé de rechercher celles d'entre elles qui répondraient le mieux à remplir les conditions nécessaires tout en conservant au sérum les propriétés spécifiques dont la mise en évidence est le principe même du séro-diagnostic.

Action du Formol sur le sang ou ses constituants

L'étude expérimentale de l'action du formol sur le sang a été dissociée dans l'étude des changements apportés au sérum et de ceux qui éventuellement peuvent être apportés aux globules rouges.

Si l'addition d'un antiseptique au sang dans de certaines proportions n'amène pas de changement visible, on est en droit de se demander si les propriétés du sérum, et notamment les propriétés spécifiques, ne sont pas modifiées.

L'action du formol sur les globules rouges en particulier présente un grand intérêt lorsque ces globules sont destinés à entrer dans un système hémolytique. C'est que si ses qualités antiseptiques font du formol un excellent agent de conservation des hématies, par ses propriétés coagulantes il est capable de « fixer » les globules rouges.

La fixation des globules peut être opérée sans que l'on constate la moindre déformation des hématies. On obtient ce résultat en employant : soit du formol en vapeur, mais alors comme nous le verrons il y a coagulation du sérum en grumeaux, soit des solutions alcooliques ou aqueuses de formol.

Par ces divers procédés, les globules rouges « fixés » gardent leur forme, mais durant peu de temps. La conservation des globules, au contraire, avec le sérum Malassez et du formol, est de longue durée.

On peut donc conserver les globules rouges, après fixation, intacts ou déformés suivant les proportions de formol.

Une action qui n'est pas à négliger non plus c'est la sédimentation que l'on peut observer lorsque l'on ajoute à une petite quantité de sang une solution formolée de sulfate de soude. Au bout de quelques heures les globules sont déposés au fond et parfaitement sédimentés.

A côté de la fixation du globule sanguin par le formol se place un autre phénomène : la stabilisation.

La stabilisation consiste en une conservation des hématies sans que celles-ci aient subi aucune modification dans leurs constitutions.

Cette stabilisation peut être obtenue par le froid.

Mais cette méthode, pendant longtemps d'un usage courant, est insuffisante, elle n'assure une stabilisation que de courte durée.

Maintenant on sait que l'addition du formol en petite quantité augmente la résistance globulaire vis-à-vis de certaines solutions hypotoniques.

De même la plasmolyse est empêchée par cet artifice.

Cette résistance globulaire croît durant un certain temps avec l'addition de formol, puis après être passée par un maximum elle diminue progressivement jusqu'à être nulle après un temps plus ou moins long.

En présence du sérum hémolytique, les globules stabilisés et les globules frais se comportent de la même façon, ce qui montre bien qu'ayant acquis une certaine résistance, les hématies ont néanmoins conservé leur fragilité globulaire.

On peut s'expliquer cette stabilisation particulière, qui ne détruit pas la fragilité globulaire, en tenant compte de l'action empêchante du formol vis-à-vis des microbes. Ceux-

ci ne pouvant vivre dans un milieu formolé ne secrètent plus de lysines, et par conséquent les globules n'ont pas lieu de se détruire, alors que si on ajoute à ces globules un sérum hémolytique l'on constate une hémolyse dans les mêmes conditions que celle obtenue à partir de globules frais. Le formol conserve donc les globules comme il conserve le sérum; le mode d'action dans les deux cas est vraisemblablement le même.

Le formol stabilise les hématies et conserve les sérums grâce, certainement pour une grande part, à son action empêchante contre les microbes.

D'autre part, sous certaines conditions l'action du formol sur le sérum se traduit par la prise en masse du sérum sous forme de gelée : phénomène auquel on a donné le nom de *gélification*.

L'addition du formol au sérum dilué permet le chauffage du mélange à la température de stérilisation sans que l'on ait à redouter la coagulation. La pratique bactériologique met à profit cette propriété pour la préparation de l'ascite artificielle, c'est-à-dire d'un milieu protéique non coagulable par la chaleur.

Ces différents modes d'action du formol nous conduisent à étudier successivement :

- 1° Action du formol sur les globules rouges;
- 2° Action du formol sur le sérum sanguin;
- 3° Le formol dans la préparation de l'ascite artificielle.

Action du Formol sur les globules rouges

Le formol (formaldéhyde, aldéhyde formique, formaline, formalose) est une solution de formol gazeux dans l'alcool

méthylique à 40 %. Il a été employé par J. BLUM en 1893 comme liquide conservateur des animaux et de leurs organes. F. BLUM s'en servit ensuite pour durcir les coupes histologiques. Cet auteur démontre l'action conservatrice que le formol exerce sur les cellules et les noyaux des animaux et des végétaux ainsi que sur les microbes, dont il permet la coloration. En même temps, F. BLUM remarque que, dans les coupes traitées par ce liquide la couleur et la forme des hématies ne subissaient aucune altération.

ENGEL fixe le sang avec une solution au 1/10^e de formol dans l'alcool absolu qu'il fait agir pendant quelques minutes.

Pour vérifier les propriétés fixatrices du réactif, on le fait agir en vapeurs et en solutions de titres différents, pendant un temps variable sur des préparations étalées et desséchées sur lames et lamelles.

Le sang mélangé avec ces solutions a été constamment examiné dans la chambre humide de Ranvier et déposé dans des pipettes fermées. Après un séjour plus ou moins prolongé dans les pipettes, ces auteurs ont pratiqué des numérations et des mensurations successives à des intervalles de plus en plus éloignés, pour se rendre ainsi compte des propriétés conservatrices du formaldéhyde. Lorsque l'on met des vapeurs de formol en présence du sang desséché, on obtient la fixation des hématies au bout d'une ou deux minutes.

Les préparations ainsi faites ne peuvent cependant être utilisées, car le sérum sanguin se coagule en grumeaux qui résistent au lavage, même prolongé pendant quinze minutes. Au bout de vingt minutes les taches qu'ils forment disparaissent, mais en même temps que les globules ceux-ci sont dissous par l'eau.

Le formol liquide pur fixe instantanément sans faire

des grumeaux, mais de même qu'après l'action de ses vapeurs les globules ne prennent plus les matières colorantes, c'est à peine si au bout d'une demi heure l'éosine leur imprime une légère teinte rose très pâle.

En solution aqueuse, le formaldéhyde ne se comporte pas comme lorsqu'il est pur vis-à-vis des éléments figurés du sang. Les solutions alcooliques permettent la fixation en diverses proportions.

Avec celle au $1/5^{\circ}$ on peut déjà produire une coloration suffisante quoique très pâle. La solution au $1/10^{\circ}$ est la meilleure, mais même avec celle au $1/15^{\circ}$ on peut obtenir de bonnes colorations.

La bonne teinte dépend, du reste, autant du titre de la solution fixatrice que du temps pendant lequel agissent celle-ci et la matière colorante. Si on laisse, par exemple, la première plus de quinze minutes sur la préparation, l'affinité pour l'éosine diminue.

La fixation du formol est plus complète quand on mélange le formol avec le sang frais.

Seules, les solutions aqueuses ont une action très limitée. Celle-ci ne se manifeste qu'autant que le formol empêche l'eau d'attaquer les globules, et cesse dès qu'on dépasse un sixième. Les hématies augmentent de volume, se gonflent, pâlisent et disparaissent peu à peu. La solution au onzième les détruit toutes au bout d'un quart d'heure; avec celle au vingtième, leur destruction est instantanée.

Si, au lieu d'eau, on emploie le sérum Malassez (sulfate de soude, D. 1020) on obtient une fixation absolue. Ces globules se conservent quelles que soient les proportions du mélange, et lorsque l'on fait des numérations successives on retrouve ces globules immuables au bout de trois mois. Le

pouvoir fixateur cesse lorsque la dilution est trop considérable. Il commence à s'affaiblir dans celle au $1/500$, et dans celle au $1/2000$ les globules disparaissent totalement au bout de huit jours.

L'utilité de l'association du formaldéhyde et de la solution au sulfate de soude est primordiale.

Le sérum Malassez pur conserve parfaitement la forme et les dimensions moyennes des hématies, mais il ne doit pas être laissé longtemps en contact avec elles, car il finit par les dissoudre, circonstance qui le rend d'ailleurs précieux pour mesurer leur degré de résistance.

Lorsque les hématies sont très vulnérables, dans les anémies pernicieuses par exemple, on les voit disparaître pendant la numération, inconvénient auquel on s'oppose par l'addition de formol — c'est-à-dire que le meilleur est d'employer le sulfate de soude pur pour faire des numérations rapides, lorsque le sang n'est pas altéré, et pour étudier la résistance globulaire; et de le mélanger au formol lorsque le sang est vulnérable, et qu'on a besoin de pratiquer des numérations successives et à de longs intervalles.

La solution de chlorure de sodium formolée est aussi un liquide conservateur de premier ordre — les mélanges sanguins enfermés dans les pipettes donnent les mêmes résultats qu'avec le sulfate de soude.

Le titre de la solution à employer n'est pas indifférent, car en outre de sa propriété fixatrice, le formol possède celle de déformer les hématies. A l'état de pureté il les déforme presque totalement.

Cette action est indépendante de son acidité, ainsi qu'on peut s'en assurer en le neutralisant.

Sous son influence, les globules se ratatinent et prennent la forme de petits pelotons.

Par l'hydratation, le nombre des globules déformés diminue et leur altération devient partielle. Ils se déplissent et apparaissent garnis de petits points marginaux entre lesquels les bords se renversent et perdent leur convexité. C'est dans la solution aqueuse au cinquième et au sixième qu'on observe le plus de globules inaltérés.

Avec le sulfate de soude, des déformations analogues se produisent, et même dans un mélange aux deux millièmes on trouve çà et là quelques globules altérés, mais on arrive à constituer une solution sans effet déformateur. Elle n'est pas la même pour tous les formols, car ils présentent de légères différences, mais avec un formol frais la solution optima est celle au centième, et une fois préparée elle se conserve peut-être mieux que le formalhéhyde liquide pur.

Avec le chlorure de sodium, le mélange le plus favorable est constitué par un gramme de formol dans une solution allant du 1/85 au 1/100. Dans d'autres proportions, le chlorure de sodium formolé conserve aussi bien les globules sanguins, mais ils deviennent granuleux.

Action des solutions optima sur les diamètres des globules

On constate que dans les préparations sèches la moyenne est plus élevée que dans le sulfate de soude et que dans le sérum formolé elle se rapproche de celle des premières : résultats trouvés constamment.

Les courbes que l'on peut tracer avec les chiffres obtenus par les mensurations successives sont aussi régulières dans les trois cas mentionnés que lorsque les hématies sont

mélangées avec le chlorure de sodium formolé. Elles sont au contraire très irrégulières quand on emploie des solutions déformatrices.

MALASSEZ avait déjà indiqué ce fait, que les globules sanguins diminuent de diamètre dans le sulfate de soude et qu'ils augmentent par le dessèchement, de telle façon que leur diamètre exact se trouve compris entre les deux.

Le formol ne donne pas non plus les dimensions des globules vivants, puisqu'il produit aussi leur augmentation.

Ces changements ne sont qu'apparents, ainsi que MALASSEZ l'a démontré, car ils correspondent à des modifications de la forme plutôt que du volume, et le globule n'apparaît plus grand dans les préparations sèches que par suite de son aplatissement.

Malgré la légère augmentation que les globules subissent dans les préparations sèches, MALASSEZ les emploie exclusivement dans ses mensurations, parce que les résultats qu'on obtient sont plus constants, et partant comparables entre eux. La mensuration des globules desséchés en même temps que suspendus dans le formol montre une concordance tellement frappante qu'on ne peut hésiter à les considérer comme pareils.

Le formol possède encore la propriété de favoriser la sédimentation du sang. Lorsque l'on verse une petite quantité de sang dans un tube renfermant du sulfate de soude ou du chlorure de sodium en solution formolée, on trouve au bout de quelques heures les globules déposés au fond et complètement séparés du liquide, qui reste transparent. Si on examine le sédiment au microscope, on y trouve les hématies intactes, la sédimentation est si complète que le sédiment persiste quand on le transporte dans de l'eau distillée.

Donc, le formol fixe, déforme et sédimente les globules rouges du sang, suivant la manière dont il est employé.

Qu'il aide ou non à la fixation ou à la sédimentation des globules rouges, le formol peut assurer leur conservation.

La conservation des globules, à laquelle plus volontiers le nom de *stabilisation globulaire*, peut être assurée par le formol ; a été bien étudiée par ARMAND DELILLE et L. LAUNOY en 1911.

La stabilisation des globules rouges peut être obtenue quand on dispose d'une glacière. Ces globules rouges (globules de mouton, par exemple) gardent intacts à la glacière leurs propriétés biologiques pendant une période qui varie de cinq à huit jours.

Dans les conditions ordinaires de la récolte des globules prélevés à l'abattoir, forcément sans grandes précautions, on peut considérer cette durée de cinq à huit jours comme un maximum.

La nécessité de renouveler constamment les globules qui constituent le système hémolytique dans la pratique de la déviation du complément, complique singulièrement l'emploi courant de la méthode de Bordet-Gengou.

L'addition de très petites quantités d'aldehyde formique aux émulsions globulaires permet de conserver à la température ordinaire pendant huit jours au moins les globules rouges provenant d'animaux sacrifiés aux abattoirs.

L'action fixatrice du formol sur les cellules animales est depuis longtemps connue.

Relativement au pouvoir fixateur de ce corps sur les globules rouges, il faut accorder à BENARIO le mérite de l'avoir démontré pour la première fois. Mais c'est, comme nous l'avons vu, MARCANO qui, le premier, fit une étude sys-

tématique de l'action de l'aldéhyde formique sur les globules rouges.

L'études des propriétés biologiques des globules fixés est faite pour la première fois par G. N. STEWART, en 1901.

Cet auteur s'était servi, comme agents fixateurs, de formol, d'acide osmique, de la chaleur. En 1902, MATTHES étudie les propriétés des globules fixés par le bichlorure de mercure. En 1907, DUNGEM et COCA observent que des globules rouges fixés par l'acide osmique peuvent être laqués dans un sérum hétérogène.

STEWART, dans un volumineux mémoire consacré à l'exposé des recherches sur l'hémolyse, expose dans un paragraphe spécial les propriétés des globules fixés par le formol.

Cet auteur remarque que dans la fixation par le formol l'hémoglobine est transformée en méthémoglobine; les globules fixés par la méthode de STEWART (sang de bœuf 1 volume, solution d'aldéhyde formique à 4 % en NaCl 1 volume) ne sont pas laqués par l'eau distillée, ni par l'action des agents hémolytiques ordinaires. Mais ils peuvent être laqués par le chauffage avec de l'eau ammoniacale.

En 1909, GUYOT observe que des globules fixés par le formol se laissent agglutiner par des sérums hétérogènes, par des sérums préparés, et par des substances agglutinantes, le stroma des globules se laisse également agglutiner.

La méthode d'ARMAND DELILLE et LAUNOY diffère de celle de STEWART et GUYOT en ce que ces auteurs, ayant étudié des globules fixés, étaient obligés de faire agir des quantités relativement fortes d'aldéhyde.

Les globules fixés par le formol sont des globules dénaturés, qui ne pouvaient en aucune façon convenir pour le but spécial auquel ils les destinaient.

En effet, quand on fait agir sur des hématies les proportions de formol indiquées par STEWART et GUYOT, un certain nombre de globules sont laqués, le liquide est coloré, d'autre part, quand la fixation est complète, les globules formolés sont capables de résister aux procédés de laquage ordinaire des globules frais.

Comme ARMAND DELILLE le démontre, les globules traités par le formol en solution très diluée, n'ayant aucun pouvoir fixateur, présentent tous les caractères biologiques des globules frais.

1. — Action des différentes dilutions de Formol

D'une façon générale, pour des globules de mouton lavés, les solutions de formol dans l'eau salée représentant des dilutions de 1 à 10 % de la solution commerciale ne provoquent pas immédiatement l'hémolyse — les globules restent rouges, la vivacité de leur coloration est même plus accentuée à partir des dilutions à 4 ‰. A partir des dilutions à 6 ‰, on observe de la méthémoglobinisation en quelques heures, trois heures, à 23° des globules plongés dans une solution chlorurée sodique contenant 8 ‰ d'aldéhyde formique à 40 % deviennent légèrement brunâtres; après quatre heures et demie d'action, la présence de méthémoglobine est très évidente déjà pour des dilutions à 7 ‰. La transformation de l'hémoglobine a lieu sans passage de matière colorante dans le liquide, et sans déformation très accentuée.

Cependant, pour des dilutions à 10 ‰ de formol, les globules perdent leur aspect biconcave, ils apparaissent sphériques, ils sont colorés en brun.

Quand le contact des globules avec la solution de formol

est prolongé pendant vingt-quatre heures, on note de la plasmolyse à partir des dilutions à 10 pour 1000.

Quand on fait agir sur les globules de mouton des solutions de formol plus concentrées, on observe mieux l'action plasmolytique du formol.

La plasmolyse est rapide, elle s'accompagne de la transformation de l'hémoglobine en produits de couleur brune.

Après une heure à la température du laboratoire, pour une dilution à 20 pour 1000, l'hémolyse est incomplète, la coloration brune du liquide est peu accentuée. A partir des dilutions à 20 pour 1000 l'hémolyse est très rapide, la transformation de l'hémoglobine est simultanée à l'hémolyse.

Quand on examine après vingt-quatre heures de contact des tubes contenant un mélange de 9 cm. cubes de solution formolée, plus 1 cm. cube d'émulsion globulaire, on note pour des dilutions égales ou supérieures à 20 pour 1000 d'HCHO à 40 % l'aspect suivant : Dans les tubes, abondant précipité brunâtre; l'examen microscopique démontre la présence dans la masse amorphe des stromas globulaires, sphériques — les stromas globulaires sont le plus généralement agglutinés par petits paquets.

Ces dilutions de formol commercial inférieures à 10 pour 1000 peuvent seules convenir à la stabilisation des globules de mouton.

Les dilutions de 1 à 10 pour 1000 d'aldéhyde formique du commerce ne provoquent pas de plasmolyse sensible, tout au moins pendant les vingt-quatre heures.

Les dilutions égales, et à fortiori inférieures, à 5 pour 1000 ne transforment pas l'hémoglobine en méthémoglobine, sauf après un contact prolongé.

Les dilutions même très faibles (1 ‰ de HCHO provoquant rapidement la sédimentation globulaire.

II. — Résistance des globules stabilisés par le Formol aux solutions hypotoniques

ARMAND DELILLE et LAUNOY ont montré que l'addition de traces de formol dans le but de conserver des globules rouges est préférable à la glacière.

D'autre part, l'addition de traces de formol augmente la résistance globulaire aux solutions de NaCl hypotoniques. L'augmentation de la résistance globulaire est transitoire, elle peut être observée pendant les cinq premiers jours qui suivent la formolisation.

La dilution à 4 pour 1000 de la solution commerciale stabilise fortement les hématies; les émulsions globulaires additionnées d'une dose d'aldéhyde formique variant de 0,5 pour 1000 à 2 pour 1000 présentent au bout de quelques jours une plasmolyse légère. La transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine y est très lente. Pour ces raisons, la dilution à 2 pour 1000 paraît être la meilleure. On peut trouver de grandes variations relativement au temps de conservation des globules, ces variations sont parallèles à la plus ou moins grande résistance globulaire des éléments examinés.

Chez le mouton, en particulier, et pour des globules lavés, la résistance globulaire présente des variations non négligeables. Ces variations se retrouvent sur les globules après l'action de l'aldéhyde formique. Les écarts observés dans la résistance globulaire des hématies provenant de dif-

férents moutons sont en grande partie sous la dépendance de facteurs extrinsèques.

Ces écarts peuvent reconnaître leur cause dans la différence du temps de secouage au cours de la défibrination du sang par exemple, dans les différences survenues au cours de manipulations ayant trait au lavage et à la centrifugation des globules, on voit aussi que la stabilisation des globules est au maximum immédiatement après l'action de l'aldéhyde formique; après quelques jours (quatre à cinq jours), la résistance globulaire des hématies stabilisées diminue ensuite régulièrement, mais lentement, pour devenir inférieure à celle des mêmes éléments examinés immédiatement après la prise de sang.

Donc ceci autorise bien à donner aux globules le nom de *globules stabilisés*. Les conclusions précédentes formulées pour les globules de mouton s'appliquent à ceux de cheval et de bœuf.

III. — Action des sérums hémolytiques sur les globules stabilisés par le formol

L'examen de l'action des sérums hémolytiques sur les globules frais d'une part, et sur les globules stabilisés par le formol d'autre part, montre un parallélisme étroit.

Les globules stabilisés se comportent exactement de la même façon que les globules frais, pendant une période de quinze jours à trois semaines; cependant il faut noter une légère diminution de leur résistance aux hémolysines, parallèle au vieillissement, et absolument comparable à leur diminution de résistance aux solutions hypotoniques.

Comme pour le mouton, il y a pour les globules de

bœuf parallélisme absolu entre les globules frais et les globules formolés. Les expériences faites en partant de globules formolés employés dans les systèmes hémolytiques servant aux réactions de BORDET et GENGOU, de WASSERMANN et BRUCKE, montrent que dans tous les cas ces globules se sont conduits comme des globules frais. En particulier, l'expérience de BORDET et GENGOU a été réalisée avec le vibrion cholérique, puis avec le sérum antiméningococcique, et enfin avec le sérum antidiphthérique, en prenant la toxine diphthérique comme antigène : partout les résultats sont parallèles avec les globules formolés et avec les globules frais.

Quand on fait agir et laisse en contact sur des hématies lavées de mouton, de bœuf, de cheval, des solutions de formol de concentration déterminée (2 pour 1000 à 0,5 pour 1000), on constate que :

Il ne se produit ni hémolyse ni formation notable de méthémoglobine pendant une période d'assez longue durée, environ quinze jours pour la dilution à 2 pour 1000 ;

Les solutions ainsi traitées peuvent se conserver à la température du laboratoire en conservant intacts leurs caractères morphologiques ;

La résistance globulaire vis-à-vis des solutions hypotonique de NaCl n'est pas altérée. Pendant les quatre à cinq premiers jours qui suivent la formolisation, la perméabilité globulaire vis-à-vis du NaCl (9,5 pour 1000) est diminuée, la résistance est plus grande.

Dans les jours qui suivent, la perméabilité redevient normale, puis diminue graduellement jusqu'à devenir inférieure à celle des globules frais.

Les globules stabilisés par le formol sont en tous points comparables aux globules frais lavés, quand on les examine

au point de vue de leur résistance aux agents hémolytiques, tels que les sérums naturels ou préparés.

La conservation des globules de mammifères (bœuf, cheval, mouton) par l'emploi du formol en solutions très diluées est de beaucoup supérieure à celle réalisée par le froid.

2° ACTION DU FORMOL SUR LE SÉRUM SANGUIN

Cette action du formol sur les sérums sanguins est complexe, elle varie avec un grand nombre de facteurs, et est à l'heure actuelle encore mal expliquée dans son processus.

Lorsque l'on prend un tube contenant du sérum, et que l'on y ajoute quelques gouttes de formol, on voit dans un temps variable le sérum devenir opalescent.

En renversant le tube sans que celui-ci soit bouché, on constate qu'aucun liquide ne s'écoule : le sérum est pris en masse, il est gélifié.

On peut l'extraire du tube, il apparaît ayant conservé la forme du récipient dans lequel il était contenu — c'est une gelée.

Cette gelée présente une consistance plus ou moins grande suivant la quantité de formol employée.

Cette quantité implique aussi une durée de prise en gelée variable.

Cette réaction a tout d'abord été mise à contribution par GATÉ et PAPACOSTAS en 1920, pour en déduire un procédé de diagnostic de la syphilis.

Puis en 1922, reprenant l'étude de cette réaction, ces auteurs affirment que « dans des conditions d'expériences déterminées et faciles à réaliser, une proportion infime de formol, soit III gouttes, amenait en un temps variable de vingt-quatre à quarante-huit heures la gélification et la prise

en masse d'un centimètre cube de sérum syphilitique, au point que le tube renfermant le sérum pouvait être retourné sans qu'il s'écoulât la moindre quantité de liquide.

Cette réaction ne se produit pas avec les sérums non syphilitiques à WASSERMANN négatif.

Il semblerait donc que le sérum agisse sur le sérum humain pour le gélifier à la condition que le réactif soit utilisé en quantité suffisante.

Cette réaction est banale, commune à tous les sérums, et se produit immédiatement. Par contre, le formol utilisé à la dose de III gouttes amène en trente-six heures environ la gélification du sérum syphilitique à réaction de WASSERMANN positive, alors que dans les mêmes conditions il reste inactif vis-à-vis des sérums non syphilitiques à réaction de WASSERMANN négative.

Cette dernière réaction, qui répond peut-être à la gélification lente de certaines albumines ou de certaines substances respectées ou non par la réaction au formol à doses massives, se produit lentement, reste particulière aux sérums syphilitiques, et répond du reste non à une précipitation, mais à une gélification. »

La question de la spécificité de la réaction de gélification vis-à-vis des sérums syphilitiques a été reprise ultérieurement par différents auteurs, entre autres E. NICOLAS et PANISSET, et D. COMBIESCO, qui sont arrivés à des conclusions opposées à celles de GATÉ.

Pour E. NICOLAS et PANISSET, D. COMBIESCO, comme nous le verrons, la démonstration de la non spécificité est faite.

GATÉ et PAPACOSTAS se sont demandés si, dans la gélification du sérum par le formol, le gel ne « captait pas les

substances susceptibles de fixer le complément dans la réaction de Wassermann. »

Tous les essais qui ont été poursuivis dans ce sens n'ont pas fourni de réponse à cette question, parce que l'hémolyse a toujours fait défaut même dans les tubes témoins ne contenant pas d'antigène et les auteurs ont été portés à penser « qu'il fallait donc vraisemblablement incriminer l'action anti-hémolytique du formol. Celle-ci est certaine, disent-ils, car à petites doses le formol empêche l'action du « couple complément — de Cobaye — sérum hémolytique lapin anti Mouton » sur les hématies.

Nos recherches ne confirment pas les résultats annoncés par GATÉ et PAPACOSTAS, et au contraire sont en parfait accord avec celles de E. NICOLAS et L. PANISSET, publiées en 1922, et que nous résumons maintenant.

Le formol, lorsqu'il a été ajouté à du sérum hémolytique, est loin d'exercer une action empêchante aussi complète sur la manifestation des propriétés spécifiques de ce sérum.

Le sérum hémolytique était du sérum provenant d'un cheval (et non d'un lapin comme à l'ordinaire) traité par des hématies de mouton. Ce sérum était additionné de formol du commerce dans des proportions qui ont varié de 1 à 50 centimètres cubes de formol pour 1000 de sérum. Le sérum formolé était mis en présence des hématies de mouton dès l'addition du formol, ou seulement après quelques heures de contact, soit à la température du laboratoire, soit à l'étuve. Au bout d'une heure de séjour à l'étuve du mélange hématies sérum, on ajoutait de l'alexine de cobaye, et on observait les résultats. Dans chaque essai l'on a déterminé l'activité du sérum hémolytique, et les auteurs se sont maintenus à la limite de cette activité de telle façon qu'avec la plus petite

dose utilisée (généralement une goutte de sérum dilué au dixième) l'hémolyse était incomplète.

Ajouté dans la proportion de 1 à 50 pour 1000 en volume, le formol n'a jamais empêché l'apparition de l'hémolyse — à 1,2 ou 5 pour 1000, le formol n'a paru exercer aucune action; il n'est pas plus capable d'empêcher la réaction que de retarder son apparition ou de modérer ses effets. A des taux plus élevés, il arrive que l'hémolyse est moins complète avec un sérum formolé qu'avec un sérum non formolé, sans qu'il soit possible de dire si cette action inhibitrice, toujours légère, est constante et régulière.

Le formol dilué dans la solution physiologique aux mêmes taux que ceux auxquels il était ajouté au sérum s'est toujours montré sans action sur les hématies dans les tubes témoins.

Ces résultats ont été corroborés par ceux auxquels sont arrivés ARMAND DELILLE et LAUNOY qui, comme nous l'avons vu, en ajoutant le formol même dans la proportion de 10 pour 1000 aux hématies — l'autre élément du système hémolytique — ont vu que la réaction n'était modifiée en rien; la formolisation du sérum hémolytique ne semble donc pas avoir plus d'inconvénient ni plus d'influence sur la réaction que la stabilisation des hématies par le formol telle qu'elle est d'un usage courant dans les laboratoires.

Ces résultats semblent aussi avoir une autre portée, puisqu'ils prouvent que l'addition de formol, même dans une proportion capable de gélifier au bout d'un certain temps (deux à trois jours) ne modifie pas certains anticorps que ce sérum peut renfermer.

Plus tard, E. NICOLAS compara l'action gélifiante du formol sur les sérums et les plasmas.

Comme on pouvait le prévoir, la gélification des plasmas est plus rapide que celle des sérums.

Dans le cas du plasma, et en partant de la dose de formol la plus élevée pour arriver à la plus faible, la gélification est complète après des temps allant de 2 heures 30 à 22 heures, et les gelées obtenues sont opaques.

Les doses de formol employées sont de 0,1 centimètre cube à 0,5 centimètre cube pour 10 centimètres cubes de plasma ou sérum, le retard à la gélification atteint vingt-quatre heures et même quatre jours avec la dose la plus faible de formol. Les gelées obtenues sont bien moins opaques que les précédentes. Cette différence dans la rapidité du phénomène et dans l'aspect des gelées est expliquée par E. NICOLAS en tenant compte de la différence de constitution des deux liquides, et il serait vraisemblable d'admettre que c'est au fibrogène surtout qu'elle est imputable.

Le fibrogène est dans le plasma en quantité voisine de quatre grammes par litre. C'est d'autre part une globuline particulièrement fragile, coagulable par la chaleur à une température relativement basse (56°), et qui se transforme aisément sous l'influence de la thrombine (formation de la fibrine) entraînant la prise en masse du milieu où elle se trouve (sang, plasma, etc...).

Il n'est donc pas étonnant que malgré la proportion relativement faible en laquelle elle est contenue dans le plasma cette globuline intervienne pour accroître fortement la rapidité de la gélification de ce liquide par l'aldéhyde formique.

COMBIESCO, en 1922, étudia aussi la gélification des sérums de quinze sujets atteints de scarlatine. Il a trouvé trois réactions de gélification et une réaction de Wassermann positive. Le sérum du sujet qui a donné un Wassermann posi-

tif a réagi au formol — dans ce cas il s'agissait d'un malade ayant présenté des symptômes cliniques de syphilis.

Dans les antécédents des deux autres, qui ont donné une formol-gélification positive, il n'y avait aucun indice d'infection syphilitique. Chez le scarlatineux syphilitique, la gélification du sérum commençait une heure après l'addition de formol, et était complète après deux heures et demie ou trois heures.

Les examens répétés du sérum des érysipélateux donnent une discordance complète des deux réactions de Wassermann et Gaté Papacostas.

D'après COMBESCO, on peut admettre que dans les maladies éruptives (au moins dans la scarlatine et l'érysipèle) les substances colloïdales des sérums soient dans un équilibre instable, et que le formol favorise l'apparition du « gel ».

Influence de la concentration des sérums sur leur formolgélification par évaporation

Différents auteurs ont étudié la réaction de gélification, tantôt en laissant leurs récipients ouverts, tantôt en les bouchant au coton, à la paraffine ou au liège.

PAUZAT fait sept réactions en double, et obtient des résultats identiques en fermant au coton et à la paraffine.

BURKE constate que les tubes ouverts formolgélifient les premiers, puis ceux bouchés au liège. Il préfère la formolgélification en tubes ouverts (surtout placés à 37°), parce que cette technique lui donne plus de concordances positives entre les indications de la formolgélification et celles du Wassermann.

A. BESSEMANS se sert d'échantillons du même sérum formolé, les uns placés sous une cloche exciccatrice en réci-

pients ouverts ou bouchés au liège, les autres à l'air libre en bouteilles ouvertes, scellées ou bouchées au coton ou au liège. Les conditions de température sont identiques pour tous les échantillons. Or, il constata que la gélification se produisait d'abord dans les récipients ouverts de l'exciccateur, puis dans ceux ouverts à l'air libre, enfin et simultanément dans les flacons scellés et dans ceux bouchés au liège.

Par addition de sels. — On obtient une accélération de la formolgélification en ajoutant aux sérums formolés un des sels à l'état solide qui coagulent les globulines, soit du $(\text{NH}_4)^2 \text{SO}_4$, mieux du NaCl , ou mieux encore du MgSO_4 .

D'ailleurs, en ajoutant l'un de ces sels avant l'addition de formol, on obtient aussi l'augmentation du pouvoir formolgélifiant.

A noter que les effets obtenus par évaporation sont bien plus grands que ceux obtenus par l'addition de NaCl en quantité suffisante pour créer une concentration salée équivalente à celle provoquée par l'évaporation. Cela montre que l'évaporation n'active pas seulement en augmentant la concentration salée, mais encore et surtout en concentrant les substances formolgélifiantes.

Influence de la concentration des sérums sur leur pouvoir formolgélifiant

a) *Par évaporation.* — En concentrant des sérums formolgélifiants par leur évaporation à froid avant de les traiter par le formol, on augmente invariablement leur pouvoir formolgélifiant. Parfois même on confère ainsi ce pouvoir à des sérums qui en semblaient dépourvus.

Influence de la température sur la formolgélification

GATÉ et PAPACOSTAS ont signalé que le séjour à l'étuve ne modifie pas la formolréaction, mais BURKE a étudié systématiquement la question, et il a placé des échantillons de mêmes sérums formolés à la glacière, à la température du laboratoire à 37° (tubes non fermés). Il a constaté que d'abord gélifiaient les tubes de l'étuve, puis ceux mis à la température ordinaire.

BESSÉMANS confirme les observations de BURKE. Mais si une élévation de température accélère la formolgélification, c'est pour une faible part seulement, en tant que facteur favorisant des réactions biologiques, c'est surtout parce qu'elle provoque une évaporation plus active.

Influence de la dilution sur le pouvoir formolgélifiant des sérums

En traitant 1 cc. de sérum douriné de cheval chauffé une demi heure à 60° par des quantités de formol commercial variant de 16 gouttes de formol non dilué à 1 goutte d'une solution au seizième dans de l'eau distillée, on obtient des résultats qui montrent qu'en diminuant comme en augmentant progressivement les quantités de formol, on retarde progressivement la gélification jusqu'à suppression; que les limites dans l'un ou l'autre sens sont d'autant plus éloignées que le pouvoir gélifiant du sérum est plus faible; enfin qu'il existe une proportion optimale de formol et de sérum, proportion, qui d'ailleurs, ne varie que peu suivant les diverses espèces de sérums examinés.

Mais en variant ainsi les doses de formol, on réalise forcément des dilutions variables du sérum expérimenté.

Une quantité fixe de formol (2 gouttes) ajoutée à 1 cc. de sérum formolgélifiant et de plus en plus dilué avec de l'eau distillée donne un retard progressif de la formolgélification correspondant à une dilution de plus en plus grande.

Si l'on remplace l'eau distillée par de l'eau physiologique et par des solutions saturées de sel de cuisine, de sulfate de magnésie ou de sulfate d'ammoniaque, on constate que toutes ces solutions retardent la gélification plus ou moins suivant le degré de la dilution réalisée, plus ou moins aussi suivant la nature du sel.

A noter que le phénomène est constant pour tout sérum formolgélifiant, et que la gélification ne se produit pas avec les solutions seules en l'absence de formol.

A noter également que ce sont précisément les sels qui coagulent les globulines qui retardent le moins la gélification.

Dilution des sérums formolgélifiants avec d'autres solutions

a) *Avec leurs antigènes correspondants.* — Des sérums syphilitiques ou dourinés qui formolgélifient, mis en présence de leurs antigènes respectifs (utilisés pour la déviation du complément), que le formol soit ajouté immédiatement ou après contact antigène-sérum (même contact prolongé à 37°) voient leur gélification simplement retardée, comme si la dilution avait été faite avec de l'eau physiologique.

b) *Avec des sérums divers.* — Ici, tout dépend du pouvoir formolgélifiant du sérum employé pour la dilution. En d'autres termes, la gélification sera avancée, retardée, ou nullement influencée, suivant que le sérum ajouté est plus ou moins gélifiant ou possède la même puissance gélifiante que le sérum auquel on l'ajoute.

Il va de soi que la proportion de la dilution joue son rôle habituel.

c) *Avec des solutions d'hémoglobine.* — Cette fois-ci, c'est avant tout une question de concentration de la solution utilisée, car une solution d'hémoglobine suffisamment concentrée acquiert un pouvoir formolgélifiant propre. C'est ainsi que des globules rouges humains, lavés trois fois, et qu'on fait éclater dans de l'eau distillée à telle concentration que la solution obtenue correspond colorimétriquement à soixante-quatre fois la concentration de l'étalon de l'hémoglobinomètre Sahli, formolgélifient au bout de quelques minutes avec deux gouttes de formol. De même une solution d'hémoglobine de mouton équivalente à quarante concentrations étalons Sahli donne une formolgélification positive après seize heures, tandis qu'à une concentration de dix étalons Sahli, elle ne formolgélifie plus qu'au bout de douze jours.

Ces solutions d'hémoglobine semblent d'ailleurs se comporter, à quelques différences près, comme des sérums formolgélifiants.

En effet, leur pouvoir formolgélifiant est augmenté par un chauffage d'une demi-heure à 56° , tandis qu'il n'est pas influencé par la congélation.

En les traitant par des quantités variables de formol, leur gélification est progressivement retardée par l'augmentation comme par la diminution des doses de formol à partir d'une certaine quantité optima.

Leur dilution avec de l'eau physiologique retarde moins leur gélification que ne le fait leur dilution avec de l'eau distillée et leur dilution avec des solutions saturées de NaCl Mg SO¹ ou surtout de (NH⁴)² SO¹ la retardent encore beau-

coup moins que ne le fait leur dilution avec de l'eau physiologique.

Enfin, leur mélange à un sérum quelconque accélère, retarde, ou n'influence nullement la formolgélification de ce dernier, suivant que le pouvoir formolgélifiant de la solution d'hémoglobine est plus fort, plus faible, ou le même que celui du sérum.

Nous avons vu à différentes reprises que les auteurs qui se sont attachés à l'étude de la gélification des sérums sont d'accord pour admettre que la réaction de formolgélification n'est pas spécifique vis-à-vis des sérums de sujets atteints de syphilis.

On tenta cependant de reproduire cette formolgélification avec le sérum d'animaux atteints d'autres maladies.

COMBIESCO, en même temps qu'il cherchait une explication à la production du « gel », remarqua que l'on obtient ces réactions avec le sérum de sujets souffrants de maladies éruptives telles que l'érésipèle et la scarlatine.

L. PANISSET et J. VERGE étudièrent la formolgélification de quelques sérums provenant soit de bovins sains, soit de bovidés tuberculeux, atteints d'entérite chronique hypertrophiante ou infectés expérimentalement de *Bactérium phléi* par VALLÉE et RINJARD, soit enfin d'un chien tuberculeux.

Ils adoptèrent la méthode de GATÉ-PAPACOSTAS selon la technique suivante :

Dans de petits tubes à agglutination, on verse 1 cc. de sérum clair auquel on ajoute trois gouttes de formol à 40 %. On agite le mélange, on bouche au coton, on laisse à la température du laboratoire (18 à 20°), et on lit les résultats après vingt-quatre et après quarante-huit heures.

Les réactions positives seront celles correspondantes à

des tubes où la prise en gelée tremblotante sera telle que les tubes puissent être retournés sans qu'il s'écoule la moindre quantité de liquide.

L'expérience porte sur des sérums non chauffés et sur des sérums inactivés par trente minutes de chauffage à 56° ou à 60° .

Les sérums de bovins sains donnent en quelques cas des réactions positives.

Cette formolgelification s'accuse d'autant plus que les sérums ont été inactivés à une température plus élevée : en effet, si le pourcentage est à peu près identique pour les sérums non chauffés et pour ceux chauffés à 56° , le taux s'élève considérablement pour ceux inactivés à 60° .

Il en va de même lorsqu'il s'agit de bovins tuberculeux. La réaction positive semble constante avec tous les sérums tuberculeux inactivés par chauffage d'une demi-heure à 60° . Est-ce à dire que la formolgelification en ce cas est spécifique, et qu'on peut dès lors lui accorder quelque valeur diagnostique ? Non, étant donné la proportion importante de sérums de bovins sains qui gélifient dans les conditions où les expériences ont été faites.

On ne peut donc, en l'état actuel des choses, reconnaître une valeur absolue à la version de GATÉ-PAPACOSTAS dans le diagnostic biologique de la tuberculose des bovidés.

On peut comparer aussi la valeur de la formolgelification sur des sérums prélevés vingt-quatre heures après la saignée et sur des sérums laissés quinze jours à la glacière (tous étaient ensuite chauffés trente minutes à 60°).

Quatorze sérums sains ont été examinés. Après quarante-huit heures, sept des premiers avaient gélifié sous l'action

du formol; douze des seconds présentaient le même phénomène.

Le vieillissement à la glacière influence donc la formol-gélification dans un sens favorable.

Il en est de même pour le chauffage. Si l'on met en parallèle 14 sérums sains chauffés à 56° et les mêmes sérums chauffés à 60°, on constate que, de ceux-ci, 7 gélifient en 48 heures tandis que, de ceux-là, 5 seulement donnent une réaction positive.

Le chauffage des sérums augmente par conséquent le nombre des formol-gélifications. Donc L. PANISSET et J. VERGE ne reconnaissent pas non plus la spécificité de la réaction de GATÉ-PAPACOSTAS vis-à-vis des sérums d'animaux tuberculeux.

Ces auteurs pensent comme COMBIESCO que là aussi il s'agit d'un équilibre installé des colloïdes plasmatiques (sériques).

De plus, le chauffage des sérums de bovidés normaux ou tuberculeux aussi bien que le vieillissement des sérums à la glacière semblent augmenter la fréquence des formol-gélifications.

3° LE FORMOL DANS LA PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Ascite artificielle

Certains microbes exigent pour se développer un milieu spécial renfermant, notamment, des protides apportés par du sérum sanguin ou par des transsudats comme le liquide d'ascite. Ainsi le méningocoque, le gonocoque pous-

sent bien dans le bouillon ascite formé de bouillon, trois parties, auquel on ajoute du liquide d'ascite, une partie.

Les difficultés rencontrées pour se procurer du liquide d'ascite, celles qui résultent de l'impossibilité où l'on se trouve de stériliser par la chaleur les milieux de culture renfermant des liquides albuminoïdes ont engagé à mettre à profit la propriété que possède le formol d'empêcher la coagulation du sérum par la chaleur

On obtient ainsi un milieu que l'on désigne dans les laboratoires sous le nom d'ascite artificielle et qui peut être utilisé comme le bouillon-sérum ou le bouillon-ascite pour la culture ou la conservation des souches microbiennes.

Pour la préparation de ce milieu, Legroux a indiqué la formule suivante : Ajouter à 500 centimètres cubes de sérum de cheval un centimètre cube de formol du commerce, mélanger, après quelques instants de contact, ajouter un centimètre cube d'ammoniaque (22° Baumé) pour neutraliser le formaldéhyde. Etendre de deux parties d'eau distillée et stériliser quinze minutes.

Recherches personnelles

Conservation des sérums destinés au séro-diagnostic

EMPLOI DU FORMOL.

En possession de ces connaissances concernant les différents modes d'action du formol sur le sang, nous avons voulu mettre en évidence les proportions auxquelles on devra l'employer pour qu'il réponde au but que nous nous sommes proposés.

Il faut, en effet, pour que le sang envoyé dans un laboratoire puisse fournir un sérum utilisable pour le séro-diagnostic, qu'il remplisse un certain nombre de conditions.

En premier lieu, le sang recueilli dans les meilleures conditions de propreté possibles devra se coaguler normalement, afin que la rétraction du caillot laisse exsuder un sérum suffisamment abondant. Ce sérum devra être limpide et clair.

Un grand nombre de diagnostics (précipito-diagnostic ; agglutino-diagnostic) étant basés sur les propriétés physiques du sérum après l'addition d'un antigène, il importe que l'on expérimente à partir d'un sérum clair.

En deuxième lieu, le sang ne doit pas être le siège d'une culture microbienne résultant du développement des germes banaux que l'on trouve dans la nature.

De plus, le sang doit posséder et conserver les propriétés spécifiques (anticorps) dont la mise en évidence constitue un précieux moyen de diagnostic.

L'antiseptique devra donc être choisi de telle manière que ces conditions soient remplies.

C'est-à-dire que l'antiseptique doit permettre une coagulation aboutissant à un caillot rétractile, ne pas provoquer l'hémolyse, présenter une action empêchante vis-à-vis des microbes banaux, tout en ménageant les anticorps du sérum.

Nous nous sommes efforcés d'étudier successivement ces différents points, afin d'en déduire une méthode permettant l'emploi du formol avec le maximum d'avantages, et ne présentant pas d'inconvénients incompatibles avec un bon séro-diagnostic.

Action du Formol sur la coagulation du sang.

Afin de nous placer dans des conditions les plus voisines de celles réalisées dans la pratique, nous avons fait toutes nos expériences en nous servant des tubes mis à la disposition des vétérinaires par le laboratoire national de recherches.

Le sang provient de chevaux sains.

Chaque série d'expériences comporte un témoin — le témoin est constitué par un tube de sang ne renfermant pas de formol.

La prise de sang est faite à la jugulaire du cheval au moyen d'une aiguille et d'une seringue stériles.

On prélève ainsi pour chaque tube 5 cc. de sang.

Au préalable, on a mis dans chaque tube une quantité de formol variable. Lorsque le sang est en présence du formol dans le tube, on bouche au moyen d'un bouchon en caoutchouc, et on assure l'intimité du mélange.

Puis, les tubes sont abandonnés au laboratoire à une température oscillant entre 15° et 20°.

1° Expérience

La première expérience porte sur des concentrations de formol allant de 10 pour 1000 à 70 pour 1000.

On fait un premier examen des tubes une heure après la prise de sang :

le tube contenant	5 cc. de sang	+	10 pour 1000 de formol	présente une prise en masse totale.
—	5 cc. de sang	+	20 pour 1000 de formol	présente une prise en masse totale.
—	5 cc. de sang	+	30 pour 1000 de formol	présente une prise en masse totale.
—	5 cc. de sang	+	40 pour 1000 de formol	présente la formolgelification.
—	5 cc. de sang	+	50 pour 1000 de formol	présente la formolgelification.
—	5 cc. de sang	+	60 pour 1000 de formol	présente la formolgelification.
—	5 cc. de sang	+	70 pour 1000 de formol	présente la formolgelification.

Le tube témoin était lui aussi pris en masse.

Si l'on décolle les caillots, on constate alors que :

Le tube contenant 10 pour 1000 de formol présente un sérum bien exsudé, mais légèrement hémolysé; il en est de même pour les tubes renfermant 20 et 30 pour 1000 de formol;

A partir de 40 pour 1000, et jusqu'à 70 pour 1000, les tubes présentent une gélification de tout leur contenu;

Le sang témoin est bien coagulé; l'exsudation du sérum est complète.

2° Expérience

La deuxième expérience emprunte les mêmes proportions de formol que la première :

le tube contenant	5 cc. de sang	+ 10	pour 1000 de formol	présente
				une prise en masse.
—	—	5 cc. de sang	+ 20	pour 1000 de formol présente
				une prise en masse.
—	—	5 cc. de sang	+ 30	pour 1000 de formol présente
				une prise en masse.
—	—	5 cc. de sang	+ 40	pour 1000 de formol présente
				une prise en masse.
—	—	5 cc. de sang	+ 50	pour 1000 de formol présente
				la formolgelification.
—	—	5 cc. de sang	+ 60	pour 1000 de formol présente
				la formolgelification.
—	—	5 cc. de sang	+ 70	pour 1000 de formol présente
				la formolgelification.

Le sang témoin est pris en masse.

Par décollement des caillots, on peut voir que :

Le tube témoin, et celui correspondant à une proportion de 10 pour 1000 de formol ajouté au sérum, présentent un caillot laissant exsuder un sérum clair ;

Les tubes correspondant à des proportions de 20, 30 et 40 pour 1000 de formol présentent un sérum légèrement hémolysé ;

Les concentrations de 50 pour 1000 de formol et au-dessus montrent la réaction de formol-gélification parfaitement réalisée.

Les résultats corroborent ceux obtenus avec la première expérience, sauf quelques variantes dues sans doute à des imperfections de manipulations, ou à tout autre cause qui demeure inconnue de nous.

3^e Expérience

L'appréciation des résultats précédents nous conduit à utiliser des quantités de formol plus faibles.

Nous nous servons de sérum, toujours 5 cc., auquel on additionnera de 1 à 10 pour 1000 de formol. Il faudra faire une dilution de formol, parce que nous serions obligés d'utiliser des fractions de goutte, ce qui n'est pas possible — la dilution sera de 1 goutte de formol pour 10 gouttes d'eau distillée.

Comme précédemment, on verra par l'examen des tubes une heure après la prise de sang que :

le tube contenant 5 cc. de sang +	1 pour 1000 de formol	montre le sang pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	2 pour 1000 de formol	montre le sang pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	3 pour 1000 de formol	montre le sang pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	4 pour 1000 de formol	montre le sang pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	5 pour 1000 de formol	montre le sang pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	6 pour 1000 de formol	montre le sang pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	7 pour 1000 de formol	montre le sérum pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	8 pour 1000 de formol	montre le sérum pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	9 pour 1000 de formol	montre le sérum pris en masse.
— " 5 cc. de sang +	10 pour 1000 de formol	montre le sérum pris en masse.

Le tube témoin est, comme toujours, aussi pris en masse.

Si l'on détache les caillots de la paroi de verre, ou si l'on attend que l'exsudation du sérum se fasse spontanément, on est en présence des faits suivants :

Partout le caillot est bien rétracté, le sérum est clair pour les concentrations en formol de 1, 3, 5, 6, 7 et 9 pour 1000; il est légèrement hémolysé pour les concentrations en formol de 4, 8, 10 pour 1000.

Il est à noter que le cheval fournisseur de sang avait reçu la veille une injection de novarsénobenzol, pour un but expérimental.

4^e Expérience

Nous avons repris, pour les opposer dans une même observation, les concentrations de formol paraissant les plus intéressantes et celles s'en rapprochant le plus, ces dernières ayant fait l'objet des deux premières expériences.

On examine les tubes une première fois, une heure après la prise de sang.

Puis, quelques heures après, un nouvel examen montre que :

le tube contenant	5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol	présente une bonne exsudation d'un sérum clair.
— — —	5 cc. de sang + 3 pour 1000 de formol	présente une légère exsudation d'un sérum clair.
— — —	5 cc. de sang + 4 pour 1000 de formol	présente une bonne exsudation d'un sérum clair.
— — —	5 cc. de sang + 5 pour 1000 de formol	présente une mauvaise exsudation d'un sérum hémolysé.
— — —	5 cc. de sang + 6 pour 1000 de formol	présente une bonne exsudation d'un sérum clair.
— — —	5 cc. de sang + 7 pour 1000 de formol	présente une bonne exsudation d'un sérum clair.

- le tube contenant 5 cc. de sang + 8 pour 1000 de formol présente une
bonne exsudation d'un sérum clair.
- 5 cc. de sang + 9 pour 1000 de formol présente une
mauvaise exsudation.
- 5 cc. de sang + 10 pour 1000 de formol présente une
bonne exsudation d'un sérum clair.
- 5 cc. de sang + 20 pour 1000 de formol présente une
mauvaise exsudation d'un sérum hémolysé.
- 5 cc. de sang + 30 pour 1000 de formol présente une
bonne exsudation d'un sérum clair.
- 5 cc. de sang + 40 pour 1000 de formol présente une
mauvaise exsudation.

Deux tubes témoins, ne contenant pas de formol, ont montré un sérum clair et abondant.

Il est permis de tirer quelques conclusions de l'appréciation systématique de ces essais.

Au préalable, nous voyons que le sang normal de cheval recueilli dans un tube présente plusieurs formes dans sa coagulation.

Alors que le sang humain commence à se coaguler 3 à 5 minutes après sa récolte, le sang de cheval se coagule plus lentement. Comme, de plus, les globules ont une densité élevée chez cette espèce animale, et se sédimentent rapidement, il se forme ordinairement à la surface du sang une couche claire de plasma exempte de globules avant la prise en masse du liquide. Le caillot présente alors à sa face supérieure une zone jaunâtre.

Il apparaît donc qu'il importe de ne pas confondre la prise en masse signalée au cours de ces expériences avec la gélification du sérum.

Cette prise en masse n'étant qu'une des phases de la

coagulation normale que l'on observe dans tous les cas où le sang est abandonné hors d'un vaisseau.

Il est facile de constater au microscope que la formation du caillot est due au dépôt de filaments enchevêtrés, la fibrine, qui emprisonne dans les mailles du réseau, et les globules, et la partie liquide du sang.

Les premiers filaments de fibrine paraissent se former à la surface des éléments incolores du sang (leucocytes pour SCHMIDT, plaquettes pour RANVIER et HAYEM).

Mais nous nous en tiendrons strictement à l'observation macroscopique de la formation du caillot.

Le caillot une fois formé est le siège d'une rétraction lente qui dure plusieurs jours; il diminue graduellement de volume, ce qui a pour effet de faire exsuder peu à peu, un liquide de couleur jaune : le sérum. Le sérum représente donc le plasma sanguin d'où la fibrine s'est séparée. Le caillot supposé complètement rétracté ne contiendrait plus que la fibrine et les globules.

Les connaissances sommaires de la coagulation spontanée du sang nous permettent d'interpréter les essais précédemment exposés.

Nous voyons que : en négligeant les essais qui ne sont pas en accord avec la majorité des expériences, et par conséquent qui ont évolué sous l'action de facteurs étrangers, les concentrations optima de formol ne gênant pas la coagulation du sang vont de 1 à 10 pour 1000.

Avec des proportions de formol allant de 1 à 10 pour 1000, nous constatons que :

1) Le sang n'a subi aucune modification, et que par conséquent sa coagulation s'effectue dans de bonnes conditions

et en un temps égal à celui mis par un sang ne renfermant pas de formol.

2) Le caillot est rétracté à peu près autant que normalement.

3) Le sérum est bien exsudé, parfaitement clair, il ne s'est produit aucune hémolyse.

Avec des proportions de formol allant de 10 à 50 pour 1000, on voit que :

Le sang est quelquefois modifié. En effet, la coagulation se fait toujours de la même façon, mais le sérum est dans quelques cas teinté de rose ou de rouge suivant l'importance de l'hémolyse.

Donc ici, bien que l'addition de formol ne provoque souvent aucune altération apparente du sang, il apparaît dans certains tubes — suivant une proportion qu'on ne peut négliger — une coloration du sérum marquant une hémolyse de celui-ci.

A des concentrations inférieures à 1 pour 1000 de formol, il est de toute évidence que le sang ne subit aucune modification du fait de cette adjonction si faible de formol.

Action bactéricide du Formol

Ayant déterminé les proportions dans lesquelles le formol doit être additionné au sang afin de respecter ses propriétés physiques, nous examinerons son action vis-à-vis des microbes :

Ceux que l'on aura à rechercher afin de déterminer la spécificité de l'affection dont est atteint le sujet, et ceux qui sont surajoutés, c'est-à-dire qui cultivent pendant le transport du sang, l'infection se produisant au cours des manipulations.

Le diagnostic fait dans les laboratoires à partir d'un prélèvement sanguin se base, en effet, soit sur une détermination directe ou après culture des microbes, soit sur la mise en évidence des anticorps du sérum.

Le problème étant ainsi posé, nous avons cherché à le résoudre en nous plaçant dans des conditions toujours comparables au cours des différents essais.

Pour cela, nous sommes parti d'un milieu stérile (le sang d'un animal sain recueilli aseptiquement), lequel a étéensemencé avec une culture pure d'un microbe déterminé. Le sang est additionné des quantités de formol que l'on veut essayer.

Ensuite, on abandonne les tubes à l'air, afin de réaliser une contamination voisine de celle obtenue pratiquement par des manipulations non aseptiques.

On pourrait nous objecter que ce manuel opératoire ne s'explique pas, mais on remarquera qu'il a pour but une condition primordiale, c'est l'infection sanguine en présence du formol.

Technique opératoire

Prélèvement du sang

Le sang est recueilli par ponction aseptique de la veine jugulaire.

L'opérateur se munit d'un flacon stérile contenant des billes de verre et d'un fin trocart. Un aide maintient la tête du cheval élevée et légèrement inclinée du côté opposé.

Au niveau du lieu d'élection de la ponction veineuse (à la limite des tiers moyen et supérieur de la région jugulaire) les poils sont coupés, puis, la région lavée, l'hémostase est

réalisée par une compression soit à la main, soit à l'aide d'un garrot fixé à la base de l'encolure.

L'introduction du trocart dans la jugulaire se fait en deux temps : 1) Ponction de la peau ; 2) Ponction de la veine.

On retire le mandrin du trocart, et après avoir laissé couler quelques gouttes de sang on ajuste le tubage de caoutchouc.

Il est préférable de faire la saignée sur l'animal à jeun, ou tout au moins en dehors de la période de digestion : pendant celle-ci, le sang contient des particules graisseuses, son sérum exsude difficilement et il est souvent opalescent.

Défibrination du sang

La défibrination du sang est réalisée en agitant le flacon contenant le sang et les billes de verre. On laisse déposer les globules, et on peut opérer ensuite sur un sérum clair.

Le sérum défibriné est réparti dans des tubes, à raison de 5 cc. par tube.

D'autre part, on a cultivé une souche de microbes (des staphylocoques par exemple) en bouillon.

Ensemencement

On procède à l'ensemencement des tubes de sang défibriné au moyen d'un fil de platine plongé dans la culture de staphylocoques, en tenant compte des indications suivantes :

1) Tenir la baguette de verre par son tiers supérieur, en passer très rapidement l'extrémité inférieure (où se trouve le fil de platine) dans la flamme d'un bec bunsen pour détruire les germes déposés à la surface du verre.

2) Porter ensuite au rouge le fil de platine, le sortir de la flamme et le laisser quelques secondes à l'air pour qu'il refroidisse.

3) Prendre le tube contenant la culture de staphylocoques, flamber le bouchon d'ouate qui ferme l'orifice pour détruire les poussières qui y sont déposées. Enlever le tampon d'ouate.

4) Plonger l'extrémité du fil de platine dans le bouillon puis reporter ce prélèvement de bouillon dans le tube de sang défibriné préparé. Refermer le tube de culture avec son tampon de coton, que l'on fera flamber une fois encore.

Cette opération sera répétée autant de fois qu'il y a de tubes de sang à ensemercer.

Formolisation

La formolisation sera l'addition de la quantité de formol voulue dans chaque tube. On abandonnera ce sang défibriné à lui-même, afin que la contamination puisse se faire, si c'est encore possible en dépit du formol.

Titrage des germes

Le titrage se fera au moyen de dilutions successives, afin que la concentration soit suffisamment faible pour que l'on puisse compter les colonies. Prendre une goutte de sang défibriné et pollué, l'ajouter aseptiquement à 10 cc. de sérum physiologique.

Liquéfier au bain-marie un tube de 10 cc. de gélose en culot. La gélose solidifiée ne se liquéfie qu'entre 60° et 100°, mais elle reste liquide jusqu'à 40°. Les tubes de gélose seront donc liquéfiés dans l'eau bouillante, puis on les laissera

refroidir jusqu'à ce que leur température soit aisément supportée par la main.

Prélever à l'aide d'une pipette une goutte de liquide de dilution du produit à examiner. Porter cette goutte dans le tube de gélose liquéfiée, remplacer le bouchon d'ouate du tube et assurer le mélange exact en roulant le tube rapidement entre les mains et non en agitant le tube de haut en bas.

Déboucher purement le tube en flambant l'orifice dans la flamme d'un bec bunsen. Ouvrir la boîte de Roux et couler rapidement la gélose; faire osciller la boîte de Roux pour étaler la gélose en couche uniforme, puis, pour éviter la production des grumeaux lors du refroidissement dans les boîtes, il est bon de placer celles-ci, avant que d'y verser la gélose, sur une platine contenant de l'eau à 40 ou 45°, et de ne laisser refroidir que progressivement.

Placer les boîtes à 37° pour empêcher la dessiccation de la gélose, disposer les boîtes dans une chambre humide constituée par un cristalliseur à cloche, dans le fond duquel on dispose une feuille de papier filtre humectée d'eau.

Dans les temps qui suivent, on examine les cultures, et l'on dénombre si c'est possible la quantité de colonies.

Lorsque ces colonies microbiennes sont confluentes, nous les qualifions d'incomptables.

Dans les autres cas, diviser la surface de la boîte en quatre parties égales, en traçant deux droites perpendiculaires passant par le centre, et compter les colonies microbiennes qui se trouvent dans le quart de la boîte de Roux ainsi fractionnée.

Ce calcul terminé, il suffira évidemment de multiplier par quatre le résultat pour obtenir la valeur exacte de la culture.

Cette méthode, que nous avons employée pour tous nos essais, ne permet pas de conclusion concernant la vitesse de végétation des microbes. De même la rapidité de reproduction et le nombre initial de microbes mis en cause n'est pas connu, car les dilutions successives sont arbitraires, mais la valeur comparative des antiseptiques peut être montrée en évaluant le développement microbien dans les boîtes de Roux grâce à la méthode unique que nous nous sommes imposée.

Première série d'Expériences

a) L'ensemencement est fait en boîte de Roux douze heures après la mise de l'antiseptique dans le sang défi-briné.

Les concentrations de formol sont de 2 pour 1000 à 40 pour 1000. La limite utile à ne pas dépasser est, comme nous l'avons dit, 10 pour 1000 : au-dessus, on constate une mauvaise exsudation du sérum et une légère hémolyse ; nous l'avons fait cependant pour nous rendre compte de l'efficacité du formol à ces doses non employables pratiquement.

Les résultats de l'ensemencement sont :

- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol : développement d'un staphylocoque en colonies incompressibles, plus un bacille gram négatif envahissant.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de formol : développement de 120 colonies de staphylocoques, plus un bacille gram négatif envahissant.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de formol : développement de 280 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de formol : développement de 190 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 6 pour 1000 de formol : développement de 100 colonies de staphylocoques.

- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 7 pour 1000 de formol : développement de 30 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 8 pour 1000 de formol : développement de 40 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 9 pour 1000 de formol : développement de 5 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 10 pour 1000 de formol : développement de 10 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 20 pour 1000 de formol : développement d'une seule colonie de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc de sang + 30 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 40 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.

L'expérience comportant deux témoins (tube de sang ne renfermant pas de formol), le premier a montré le développement d'un staphylocoque en colonies incomptables, plus un microbe gram négatif envahissant, le deuxième le développement de colonies incomptables aussi, de staphylocoques purs.

b) L'ensemencement est fait en boîte de Roux quarante-huit heures après la mise de l'antiseptique dans le sang défi-briné.

Les concentrations de formol sont évidemment les mêmes que précédemment.

Cependant, les tubes de sang contenant une quantité de formol ayant stérilisé le milieu, fait qui s'est produit à partir d'une concentration de 20 pour 1000 de formol, n'ont pas été l'objet de nouveaux ensemencements. Nous nous sommes limité au réensemencement des milieux ayant montré un développement microbien sur gélose.

La troisième observation pratiquée dans le même esprit,

considérant que le milieu stérilisé n'offrait plus d'intérêt, n'a porté que sur certains tubes.

Les résultats de l'ensemencement sont :

- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol : développement d'un staphylocoque en colonies incomptables, plus un bacille gram négatif.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de formol : développement d'un staphylocoque en colonies incomptables, plus un bacille gram négatif.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de formol : développement d'un staphylocoque, 300 colonies, plus un bacille gram négatif.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 6 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 7 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 8 pour 1000 de formol : une seule colonie de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 9 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 10 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.

Les deux témoins montrent, l'un le développement d'un staphylocoque comme précédemment, l'autre le développement d'un staphylocoque, plus un bacille gram négatif.

c) L'ensemencement est fait en boîte de Roux quatre jours après la mise de l'antiseptique dans le sang défibriné.

Les résultats de l'ensemencement sont :

- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol : déve-

loppement d'un staphylocoque en colonies incomptables, plus un bacille gram négatif.

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de formol : développement d'un staphylocoque en colonies incomptables, plus un bacille gram négatif.

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de formol : développement de staphylocoques en colonies incomptables, plus un bacille gram négatif.

Les deux témoins montrent toujours la même flore microbienne.

Deuxième série d'Expériences

a) L'ensemencement est fait en boîte de Roux douze heures après la mise de l'antiseptique dans le sang défibriné.

Les concentrations de formol vont de 2 pour 1000 à 10 pour 1000.

Les résultats de l'ensemencement sont :

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol : développement de 290 colonies de staphylocoques.

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de formol : développement de 60 colonies de staphylocoques.

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 6 pour 1000 de formol : développement de 120 colonies de staphylocoques.

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 8 pour 1000 de formol : développement de 40 colonies de staphylocoques.

pour le tube contenant 5 cc. de sang + 10 pour 1000 de formol : développement de 25 colonies de staphylocoques.

L'expérience est contrôlée par un témoin (tube de sang ne contenant pas de formol etensemencé d'un staphylocoque).

Ce témoin montre un staphylocoque en culture pure.

b) L'ensemencement est fait en boîte de Roux quarante-

huit heures après la mise de l'antiseptique dans le sang défibriné.

Les résultats de l'ensemencement sont :

- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol : développement d'un staphylocoque en colonies incomptables.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de formol : développement de 250 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 6 pour 1000 de formol : développement de 180 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 8 pour 1000 de formol : développement de 90 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 10 pour 1000 de formol : développement de 60 colonies de staphylocoques.

c) L'ensemencement est fait en boîte de Roux quatre jours après la mise de l'antiseptique dans le sang défibriné.

Les résultats de l'ensemencement sont :

- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de formol : développement de staphylocoques en colonies incomptables.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de formol : développement de staphylocoques en colonies incomptables.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 6 pour 1000 de formol : développement de 50 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 8 pour 1000 de formol : développement de 30 colonies de staphylocoques.
- pour le tube contenant 5 cc. de sang + 10 pour 1000 de formol : pas de développement microbien.

L'examen de ces essais permet de prévoir que :

- 1) Le formol employé à des doses variant de 1 à 5 pour 1000 n'entrave pas le développement des microbes au sein d'un milieu, puisque dans la première expérience les tubes de sang ayant été souillés lors de leur exposition à l'air par

un bacille gram négatif, ce bacille s'est retrouvé constamment dans les tubes ne contenant que 2, 3 et 5 pour 1000 de formol.

2) Le formol employé suivant des concentrations de 5 à 10 pour 1000 possède une propriété d'arrêt vis-à-vis du développement d'un microbe surajouté.

3) Le temps de transport normal par la poste d'un tube renfermant du sang est de quarante-huit heures à quatre jours, pour la France tout au moins, on devra conseiller pour se trouver dans les meilleures conditions possibles l'adjonction de 5 à 8 pour 1000 de formol.

On a vu, en effet, qu'à ces concentrations le microbe ensemencé gardait une résistance suffisante pour être retrouvé au laboratoire; d'autre part, au-dessous de 5 pour 1000 l'on doit craindre une pollution microbienne, et en dessus de 9 pour 1000 on assiste assez rapidement à une stérilisation du milieu.

Action du Quinosol (sulfate d'orthoxyquinoléine) sur le sang ou ses constituants

Convaincu, après essai, de l'innocuité et de la puissance antiseptique de ce corps, M. NICOLLE en a préconisé l'usage durant la guerre pour la conservation de certains sérums préparés à l'Institut Pasteur. Plus récemment, E. NICOLAS et P. RINJARD en ont fait largement usage au centre sérumigène de Bruxelles pour conserver le sérum contre la peste bovine; ils l'ont utilisé dans la proportion de 0,2 gr. de quinosol pour 1000 cc. de sérum.

Depuis, GROSS a publié des expériences tendant à démontrer que le quinosol pouvait être employé dans le but que nous poursuivons. Pour cet auteur, le quinosol doit répondre à quatre conditions, à savoir :

- 1) Ne pas nuire à l'efficacité du sérum, c'est-à-dire qu'il ne doit jamais modifier le titre du sérum.
- 2) Ne pas gêner la réaction hémolytique.
- 3) La substance doit garder le milieu contre tout germe, et ne doit pas précipiter sensiblement les albumines.
- 4) Le sérum doit le plus possible conserver sa couleur et rester limpide.

Les expériences furent faites à partir de sérum hémolytique de lapins, qui furent saignés à la fémorale. De cette façon on introduit toujours des bactéries dans le sérum. Dans

la plupart des cas il s'agissait de staphylocoques et de bâtonnets gram négatifs.

Les échantillons qui reçurent 0,5 à 1 pour 100 de quinosol présentèrent après quelques heures de forts précipités, ce qui n'eut pas lieu pour une moindre concentration de quinosol.

La concentration de 0,25 pour 100 et plus rend le milieu stérile en peu de jours, tandis que la concentration de 0,1 pour 100 ne suffisait pas. En plus, on voit qu'il est plus efficace de partir d'une solution de quinosol à 10 pour 100. Pour trouver la concentration qui conserverait le sérum stérilisé, on filtre par le filtre Seitz et l'on ajoute des solutions de 0,5 à 0,1 pour 100 — la concentration de 0,1 pour 100 suffit.

GROSS étudie ensuite l'influence du quinosol sur le pouvoir hémolytique du sérum.

Il montre que le quinosol n'a aucune action nuisible sur le pouvoir hémolytique des différents sérums, ni immédiatement après l'addition, ni après un temps plus ou moins long.

Ne possédant sur l'action du quinosol que ces données, et nous étant convaincu nous-même de la grande valeur du produit dans la conservation des sérums, nous avons voulu étudier l'influence du quinosol sur le sérum, parallèlement à l'action du formol.

Il nous faudra examiner successivement l'action du quinosol sur les propriétés physiques du sang, puis l'action conservatrice vis-à-vis des microbes se trouvant dans le sang avant sa récolte, et l'action destructive s'exerçant contre les microbes tendant à se développer après la mise de l'antiseptique.

Action du Quinosol sur les propriétés physiques du sérum

Nous partirons toujours de 5 cc. de sang, auxquels nous ajouterons des doses variables de quinosol, afin de déterminer dans quelles limites cette addition ne provoque pas de perturbation des propriétés spécifiques du sérum.

Le quinosol, afin d'être rendu facilement utilisable, est mis en solution.

La solution préparée est au 1/20°, c'est-à-dire que l'on dissout 0 gr. 50 de quinosol dans 10 grammes d'eau distillée stérilisée.

Il suffit ensuite, connaissant le nombre de gouttes au gramme, de faire un calcul donnant la quantité de gouttes à ajouter pour 5 cc. de sang, afin que les concentrations soient 1, 2, 3 pour 100 ou 1, 3 et 5 pour 100.

Le quinosol ajouté au sérum de cheval dans la proportion de 1, 2 ou 3 pour 100 détermine aussitôt une floculation du liquide en même temps que l'apparition d'une coloration d'un vert franc. Les flocons formés se sédimentent très vite, et le sérum quinosolé dans la proportion de 2 et de 3 pour 100 reste trouble.

Ces résultats ont été obtenus en laissant la réaction se poursuivre à la température du laboratoire. Si l'on opère à la température de l'étuve (37-38°), le quinosol aux taux que nous avons indiqués détermine des altérations plus profon-

des. Après vingt-quatre heures, le sérum quinosolé à 1 pour 100 montre un dépôt que résout difficilement une agitation énergique; à 2 pour 100, le liquide surnageant est épais, sirupeux; à 3 pour 100, tout le contenu du tube est pris en masse. L'addition de quinosol au sérum normal de cheval dans la proportion de 1, 2 ou 3 pour 100 provoque un léger trouble, que sa répartition dans la masse fait disparaître aussitôt.

La coloration verte du mélange apparaît plus nette dans les tubes placés à l'étuve que dans ceux conservés à la température du laboratoire.

D'autres essais destinés à confirmer les précédents nous montrent que :

un tube renfermant	5 cc. de sang + 1 pour 1000 de quinosol	présente un sérum bien exsudé.
— —	5 cc. de sang + 2 pour 1000 de quinosol	présente un sérum bien exsudé.
— —	5 cc. de sang + 3 pour 1000 de quinosol	présente un sérum légèrement hémolysé.
— —	5 cc. de sang + 4 pour 1000 de quinosol	présente un sérum bien exsudé.
— —	5 cc. de sang + 5 pour 1000 de quinosol	présente un sérum fortement hémolysé.

Ces résultats permettent de prévoir que le quinosol employé dans la proportion de 5 pour 1000 ou plus donne une coloration du sérum et une hémolyse des globules rouges qui ne permettent plus de faire les recherches de laboratoire se basant sur la précipito-réaction ou l'agglutino-réaction, qui demandent toujours, pour être nettes, une grande limpidité du milieu.

Nous avons recherché si l'addition de quinosol à un sé-

rum spécifique n'était pas capable de le modifier ou de le dépouiller de ses propriétés.

Nous avons expérimenté avec un sérum hémolytique (provenant du cheval) pour les hématies du mouton.

Le sérum hémolytique anti-Mouton a été quinosolé dans la proportion de 1, 2 ou 3 pour 1000. Les mélanges ont été conservés plusieurs heures, soit au laboratoire, soit à l'étuve. Cherchant alors à mettre en évidence les propriétés du sérum, nous n'avons observé aucune différence entre le sérum hémolytique quinosolé et celui qui n'avait pas été additionné de cette substance. Nos essais ont été assez nombreux pour nous permettre de conclure que le quinosol aux taux de 1, 2, 3 pour 1000 n'exerce aucune action empêchante ni retardatrice sur la manifestation des propriétés du sérum hémolytique.

Si l'on veut bien observer que tous nos essais ont été faits avec des sérums additionnés de quinosol dans une proportion grandement nécessaire pour assurer leur conservation, on peut en déduire que, même après un contact prolongé, le quinosol employé comme conservateur n'apporte aucune modification profonde aux sérums et qu'en particulier, dans les sérums spécifiques, il laisse intacts certains anticorps, notamment les anticorps hémolytiques.

Action bactéricide du Quinosol

Nous cherchons maintenant dans quelle mesure ce corps est capable d'entraver le développement des microbes dans les cultures, et de retarder l'apparition des phénomènes de putréfaction dans les liquides et les tissus provenant de l'organisme.

L'action inhibitrice du quinosol sur le développement des microbes a été recherchée par J. R. PEREZ et M. de OLIVIERA en se servant de la Bactéridie Charbonneuse, du staphylocoque, de la Pasteurella aviaire, du microbe de la suppuration caséuse (ou microbe de PREISZ NOCARDJ et du Bacille du Rouget du Porc.

L'addition de quinosol au milieu de culture le rend acide : c'est une condition qui ne peut qu'entraver la pullulation des microbes, mais désireux de connaître l'action propre du quinosol, il suffit de neutraliser avant l'usage les milieux quinosolés pour éviter cette acidité.

D'autre part, la stérilisation des milieux liquides (au moins ceux qui renferment plus de 1 pour 100000 de quinosol) provoque un trouble qui s'oppose à leur utilisation.

Il suffit d'ajouter à une partie de bouillon deux parties de solution chlorurée sodique isotonique pour ne pas voir ce milieu même quinosolé, se modifier après la stérilisation.

Parallèlement, dans les tubes témoins, le bouillon dilué au tiers a permis, dans de bonnes conditions, la culture de tous les microbes utilisés.

M. de OLIVIERA et J. R. PEREZ indiquent que l'action inhibitrice du quinosol est remarquable. D'après eux, il faut atteindre le taux, très bas, de 1 pour 180.000 pour que le développement de la Bactérie Charbonneuse et du staphylocoque soit possible.

Les autres germes sont encore plus sensibles dans le bouillon quinosolé à plus de 1 pour 350000, le microbe de PREISZ-NOCARD ne se développe pas; avec le Bacille du Rouget et la Pasteurella aviaire, c'est seulement dans les milieux ne renfermant pas plus de 1 pour 400000 de quinosol que la culture est possible.

A partir du taux où la culture est réalisée, en présence du quinosol, l'addition de cette substance au milieu n'a semblé provoquer aucune modification morphologique des germes.

L'action antiputride du quinosol a été recherché avec du sang, du muscle, du lait, de la substance nerveuse, sur des produits conservés à la température du laboratoire, ou mis à l'étuve à 37-38°. Dans la proportion de 2 pour 5000, le quinosol empêche longtemps la putréfaction du sang, mais son addition provoque une hémolyse à peu près complète. Pour le muscle et le cerveau, le quinosol à 1 pour 5000 n'empêche pas les altérations de se produire (formation de gaz, mauvaise odeur, présence de microbes) — cependant, avec ce taux, la coagulation du lait est entravée au moins pendant trois jours.

Il suffirait d'atteindre le taux de 5 pour 1000 pour entraver, avec tous les produits, pendant plusieurs jours, aussi bien à la température du laboratoire qu'à celle de l'étuve, tout phénomène de putréfaction : dès que des altérations putrides apparaissent, c'est toujours le staphylocoque qui a été mis en cause dans tous les essais.

Ayant fait des essais semblables, poursuivant le même but que M. de OLIVIERA et J. R. PEREZ, nous n'avons pas été amené à tirer des résultats les mêmes conclusions que ces auteurs avaient publiées en juillet 1922.

Il nous est, en effet, apparu d'une évidence incontestable que le quinosol jouit de sérieuses propriétés antiseptiques. Sa valeur, de ce point de vue, est indiscutable. Mais la divergence d'interprétation des essais vient des proportions de quinosol à utiliser pour obtenir les mêmes effets.

En la matière, et si l'on doit s'en rapporter aux deux

séries d'expériences que nous avons poursuivies, il semble que le quinosol demande à être additionné en proportion plus considérable que celles que nous avons relatées antérieurement.

Les doses employées ont varié de 1 pour 1000 à 5 pour 1000, sans arrêter irrémédiablement le développement du staphylocoque mis en cause. Nous avons opéré de manière strictement semblable à celle mettant en œuvre le formol comme antiseptique. Les mêmes mesures ont été prises pour partir d'un milieu stérile, contaminé par l'adjonction d'une culture de staphylocoque, puis recevant le quinosol.

Les prélèvements pourensemencements sont faits douze heures après la mise de l'antiseptique.

Les résultats sont pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 1000 de quinosol : développement de 4 colonies de staphylocoques.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de quinosol : développement de 215 colonies de staphylocoques.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de quinosol : développement de 150 colonies de staphylocoques.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de quinosol : développement de 90 colonies de staphylocoques.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de quinosol : développement de 3 colonies de staphylocoques.

Le staphylocoque peut donc se développer dans ces milieux quinosolés.

On peut remarquer cependant que le tube contenant le quinosol au maximum ne permet le développement que d'un nombre de colonies réduit.

Un deuxième ensemencement est pratiqué quarante-huit heures après la mise de l'antiseptique.

Les résultats sont pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 1000 de quinosol, : développement de 5 colonies.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de quinosol : développement d'un nombre in comptable de colonies.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de quinosol : développement de 98 colonies.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de quinosol : développement de 246 colonies.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de quinosol : développement de 6 colonies.

Deux tubes témoins montrent un développement de colonies en nombre in comptable d'un staphylocoque.

Deuxième Essai

Le premier ensemencement est fait douze heures après l'addition de l'antiseptique.

Les résultats sont pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 1000 de quinosol : développement de 120 colonies de staphylocoques.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de quinosol : hémolyse du milieu, donc pas ensemencé.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de quinosol : pas de développement de colonie.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de quinosol : développement de 80 colonies.
- un tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de quinosol : développement de 10 colonies.

L'hémolyse du sang dans le tube contenant 2 pour 1000 de quinosol est due à une cause accidentelle, et certainement

pas à l'antiseptique, puisque tous les autres essais ont prouvé la non altération du sang par le quinosol.

Le deuxième ensemencement est fait quarante-huit heures après l'addition de l'antiseptique.

Les résultats sont pour :

un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 1000 de quinosol : développement de 200 colonies.

un tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 1000 de quinosol : hémolysé, pas ensemencé.

un tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 1000 de quinosol : pas de développement de colonie.

un tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 1000 de quinosol : développement de 150 colonies.

un tube contenant 5 cc. de sang + 5 pour 1000 de quinosol : développement de 80 colonies.

Les tubes témoins présentent le développement d'un staphylocoque en colonies incomptables.

Nous sommes donc autorisés à penser : qu'à la dose très faible de 5 pour 1000 le quinosol est un puissant antiseptique ; à des doses supérieures à 5 pour 1000, le quinosol altère profondément les propriétés physiques du sang, il hémolyse les globules rouges et donne une coloration jaune au sérum, phénomènes qui sont incompatibles avec l'utilisation d'un sang en vue d'un séro-diagnostic ; à des doses inférieures à 5 pour 1000, le quinosol respectant les propriétés spécifiques du sang, et restant néanmoins un agent antiseptique très actif, mérite d'être utilisé comme conservateur, dans le cas d'envoi aux laboratoires. On choisira préférentiellement les proportions de 1, 2, ou 3 pour 1000, qui

permettent la culture plus sûre des microbes que l'on aura à rechercher : le quinosol aux proportions de 4 et 5 pour 1000 faisant craindre une stérilisation totale du milieu avec le temps, qui, si le voyage est un peu long, mettra le laboratoire dans l'impossibilité de retrouver les microbes en cause.

Action de la Glycérine sur le sang ou ses constituants

Le sang, considéré dans quelques cas comme un véritable tissu de l'organisme, peut être comparé aux autres éléments cellulaires dont l'ensemble forme un organe. C'est à ce titre que le sang peut reconnaître des antiseptiques tels que ceux qui servent à la conservation des fragments de viscères par exemple.

En se basant sur cette analogie, nous avons pensé que la glycérine serait capable d'être un conservateur du sang dans les mêmes conditions que les antiseptiques précédemment essayés.

Il est nécessaire que le sang soit plongé au sein de la glycérine, comme une pièce anatomique nage dans un bocal rempli d'un liquide conservateur.

Ne perdant pas de vue que physiquement le sang est un liquide, cela revient à dire que les proportions de glycérine à employer seront élevées, afin que le mélange intimement obtenu ne laisse pas de portion de sang intacte de glycérine.

La glycérine est l'alcool triatomique correspondant au propane normal.

WASSERMANN indique que la glycérine n'est que rarement utilisée pour la conservation des sérums.

D'après son procédé, EHRlich l'emploie en combinaison avec le chlorure de sodium pour garder des antigènes au laboratoire, ZÖFFLER se sert d'un mélange de 20 pour 100 de glycérine et de 0,9 pour 100 de chlorure de sodium. Les précipitines, dans ces conditions, ont conservé leur activité.

Cependant, le pouvoir de précipitation est ralenti par cette méthode, et la précipitine affaiblie.

Un autre usage intéressant de la glycérine est fait par certaines usines allemandes pour empêcher le sérum antidiphtérique de geler durant l'hiver. Ceci prouve que la glycérine n'a pas d'action nuisible sur les sérums, puisqu'elle peut être impunément ajoutée à des sérums thérapeutiques.

Les doses de glycérine que nous avons mis en œuvre vont de 50 pour 100 à 10 pour 100. La concentration à 50 pour 100 étant celle où la glycérine et le sang se trouvent à partie égale les autres concentrations sont obtenues suivant la même méthode.

Action de la Glycérine sur les propriétés physiques du sérum

La glycérine mise en présence du sang ne l'altère pas dans les instants qui suivent. Par la suite, l'on constate que la coagulation apparaît normalement, le sérum s'exsude en quelques heures, et le caillot est bien rétracté.

A toutes les proportions auxquelles nous l'utiliserons, la glycérine respecte donc les propriétés physiques du sérum.

Action bactéricide de la Glycérine

La limpidité du mélange sérum et glycérine permet de voir, après ensemencement avec un microbe convenable-

ment choisi si celui-ci a poussé, grâce au louche qui se manifeste très caractéristiquement. Nous nous servons du coli-bacille, qui conviendra particulièrement bien à cause du trouble très abondant du milieu que sa culture détermine.

Nous vérifierons la stérilité du milieu après l'examen macroscopique au moyen d'une préparation suivant la méthode de Gram, ou mieux encore d'un ensemencement sur gélose.

La culture du coli-bacille est faite en bouillon et n'est utilisée que lorsqu'elle date de vingt-quatre heures.

On procède à un premier examen vingt-quatre heures après l'ensemencement des tubes contenant le sang plus la glycérine aux doses indiquées, c'est-à-dire 50 pour 100, 30 pour 100, 20 pour 100, 10 pour 100.

Le tube renfermant la glycérine à la concentration de 10 pour 100 présente un liquide louche avec un dépôt appréciable, qui prouve que le coli-bacille a parfaitement cultivé.

Le tube contenant 20 pour 100 de glycérine montre un liquide très légèrement trouble.

Les tubes contenant 30, 40 et 50 pour 100 de glycérine ne décèlent aucun trouble du sérum.

L'examen d'une préparation de Gram faite à partir des deux premiers tubes (10 et 20 pour 100 de glycérine) montre des coli-bacilles (gram négatif), alors que la même préparation avec les autres tubes ne révèle rien.

L'ensemencement sur gélose donne pour :

le tube contenant 10 pour 100 de glycérine : développement d'un nombre incommensurable de colonies de Coli.

le tube contenant 20 pour 100 de glycérine : développement de 30 colonies de Coli.

les tubes contenant 30, 40 et 50 pour 100 de glycérine : pas de développement microbien.

Le tube témoin ne renfermant pas de glycérine contient un sérum très louche et mis en culture sur gélose montre le développement d'un nombre in comptable de colonies de coli-bacilles.

Deuxième Essai

Onensemence le sérum avec une culture de **bactérium** coli de vingt-quatre heures. L'examen des tubes est fait douze, vingt-quatre et trente-six heures après l'ensemencement.

Examen macroscopique

le tube contenant	50	pour 100	de glycérine	montre un milieu limpide.
—	—	40	pour 100	de glycérine montre un léger louche.
—	—	30	pour 100	de glycérine montre un milieu limpide.
—	—	20	pour 100	de glycérine montre un léger louche.
—	—	10	pour 100	de glycérine montre un louche abondant.

Examen microscopique

Une coloration par la méthode de gram avec les divers milieux décèle qu'avec 40, 20 et 10 pour 100 de glycérine quelques coli-bacilles vivent.

La culture sur gélose voit se développer deux colonies de coli-bacilles quand la concentration est de 40 pour 100 de glycérine.

Puis, 20 colonies quand la concentration est de 20 pour 100 de glycérine, et enfin un nombre in comptable de colonies quand la concentration est de 10 pour 100 de glycérine.

Le tube témoin permet toujours un développement remarquable de coli-bacilles.

Troisième Essai

L'ensemencement est fait comme précédemment, avec une culture de coli-bacilles de vingt-quatre heures.

Les deux premières observations ayant montré que les doses de 30, 40 et 50 pour 100 de glycérine entravaient le développement du coli, nous avons essayé des proportions plus faibles, telles que 1, 2, 5 et 10 pour 100.

Examen macroscopique

le tube contenant 10 p. 100 de glycérine donne un trouble du bouillon.
— — 5 p. 100 de glycérine donne un trouble abondant.
— — 2 p. 100 de glycérine donne un trouble très abondant.
— — 1 p. 100 de glycérine donne un trouble très abondant.

Examen microscopique

La préparation faite suivant la méthode de gram met en évidence des coli-bacilles pour chaque tube.

L'ensemencement sur gélose permet de dénombrer les colonies.

le tube contenant 10 pour 100 de glycérine permet le développement de
50 colonies.
— — 5 pour 100 de glycérine permet le développement de
250 colonies.
le tube contenant 2 pour 100 de glycérine permet le développement d'un
nombre incomptable de colonies.
— — 1 pour 100 de glycérine permet le développement d'un
nombre incomptable de colonies.

La glycérine paraît donc être un excellent antiseptique, puisqu'à partir d'une concentration de 30 et 40 pour 100 il stérilise inmanquablement le milieu.

De plus, c'est aussi un bon conservateur, puisque, respectant les propriétés physiques du sang, il est capable de permettre la présence de certains microbes se trouvant préalablement dans le sang, en empêchant la pullulation d'autres micro-organismes provenant de souillures diverses.

Entre 20 et 30 pour 100 le développement bacillaire est entravé à tel point qu'à la dose de 30 pour 100 la culture est tuée.

En dessous de 10 pour 100 la glycérine n'a plus aucune action empêchante vis-à-vis d'une culture microbienne.

Il faudra donc conseiller l'emploi de la glycérine comme conservateur du sang à la dose de 10 à 20 pour 100.

Action de l'acide borique sur le sang et ses constituants

L'acide borique, connu pour ses propriétés antiseptiques, et employé fréquemment dans un grand nombre d'affections microbiennes telles que les plaies anfractueuses compliquées, nous a semblé pouvoir se prêter à quelques essais en vue de la conservation du sang entier.

L'acide borique fut l'objet de recherches en Angleterre d'une part et en Allemagne d'autre part.

A. H. BAKER publia en 1925 les résultats des expériences entreprises pour la conservation du sang entier de volailles par l'acide borique.

Le sang était conservé en vue d'une réaction d'agglutination par le bacillus pullorum agent de la diarrhée blanche des poussins; comme en France des tubes stériles sont envoyés à l'éleveur pour la récolte du sang. L'acide borique est essayé en solution de 1 pour 100 à 1 pour 500.

A. H. BAKER note que le lendemain la séparation du sérum était bonne, il ne constate aucune hémolyse jusqu'au quatrième jour après la réception des tubes. Les petits tubes utilisés, pouvant contenir 25 cc. sont envoyés, renfermant au départ 1 cc. d'une solution d'acide borique à 5 pour 100 dans du sérum physiologique. Si le propriétaire réussit à remplir le tube, la concentration en acide borique est de 1 pour 500. Si l'éleveur n'obtient seulement que quelques gouttes, la concentration est aux environs de 1 pour 100.

La méthode d'après A. H. BAKER a été mise en usage pendant plusieurs mois. Tous les tubes renvoyés ont permis une agglutination suffisante.

En Allemagne, des essais semblables ont été faits par KALININ et GINSBURG en 1927. Ils ont opéré avec du sérum hémolytique. Les résultats sont en faveur des propriétés antiseptiques de l'acide borique puisque, recommandant son emploi à la dose de 1 pour 500, KALININ et GINSBURG ne constatent aucune influence sur l'hémolyse ni sur le titre du sérum. D'autre part, la couleur et la transparence du sérum ne seraient pas modifiées.

Enfin, les auteurs montrent que l'acide borique inhibe le développement des bactéries et des moisissures.

Ces données générales étant connues, suivant le plan que nous avons adopté, les premiers essais portent sur les modifications des propriétés physiques du sérum par l'addition d'acide borique.

Action de l'acide borique sur les propriétés spécifiques du Sérum

On ajoute à 5 cc. de sang des doses variables d'une solution d'acide borique, de telle manière que les concentrations aillent de 1 pour 100 à 1 pour 500.

Nous voyons que :

un tube contenant 5 cc. de sang	+ 1 pour 500 d'acide borique,	présente un sérum bien exsudé.
— — 5 cc. de sang	+ 2 pour 500 d'acide borique,	présente un sérum bien exsudé.
— — 5 cc. de sang	+ 3 pour 500 d'acide borique,	présente un sérum normalement exsudé.

le tube contenant 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique, présente un sérum bien exsudé.

5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique, présente un sérum légèrement hémolysé.

L'acide borique paraît donc pouvoir être employé en mélange avec le sang sans causer de perturbation des propriétés physiques de celui-ci.

Les proportions préconisées par A. H. BAKER sont celles atteignant la limite maxima, puisqu'à la dose de 1 pour 100 le sérum est déjà légèrement coloré en rose par suite d'un début d'hémolyse.

Action bactericide de l'acide borique

L'acide borique est ajouté au sang suivant les mêmes indications données lors de la recherche des propriétés conservatrices du formol. La contamination du milieu est obtenue grâce à un staphylocoque.

L'ensemencement est fait sur gélose, douze heures après l'addition de l'antiseptique pour la première fois.

Les résultats sont pour :

un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 500 d'acide borique :	développement de 70 colonies de staphylocoques.
— 5 cc. de sang + 2 pour 500 d'acide borique :	développement de 36 colonies de staphylocoques.
— 5 cc. de sang + 3 pour 500 d'acide borique :	développement de 65 colonies de staphylocoques.
— 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique :	développement de 38 colonies de staphylocoques.
— 5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique :	développement de 29 colonies de staphylocoques.

Le deuxième ensemencement est fait vingt-quatre heures après la mise de l'antiseptique.

Les résultats sont pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies.
- 5 cc. de sang + 2 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies.
- 5 cc. de sang + 3 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies, plus un bacille gram négatif.
- 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies.
- 5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique : développement de 45 colonies.

On voit que le staphylocoque cultive bien dans un milieu ainsi additionné d'acide borique.

Les tubes témoins, au nombre de deux, montrent dans l'un le développement d'un staphylocoque donnant par repiquage un nombre incomptable de colonies, dans l'autre le développement d'un bacille gram négatif outre les staphylocoques.

Deuxieme Essai

L'ensemencement pratiqué douze heures après l'addition d'acide borique montre que pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 500 d'acide borique : développement de 32 colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 2 pour 500 d'acide borique : développement de 3 colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 3 pour 500 d'acide borique : développement de 38 colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique : développement de 45 colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique : développement de 60 colonies de staphylocoques.

Le deuxième ensemencement est fait vingt-quatre heures après le premier.

Il montre que pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 2 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- le tube contenant 5 cc. de sang + 3 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- " — 5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.

Quarante-huit heures permettent donc aux staphylocoques de se multiplier abondamment.

Troisième Essai

Le premier ensemencement montre que pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- — 5 cc. de sang + 2 pour 500 d'acide borique : développement de 55 colonies de staphylocoques.
- — 5 cc. de sang + 3 pour 500 d'acide borique : développement de 59 colonies de staphylocoques.
- — 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique : développement de 42 colonies de staphylocoques.
- — 5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique : développement de 19 colonies de staphylocoques.

Un tube témoin révèle 70 colonies, et un autre tube témoin 80 colonies de staphylocoques.

Le deuxième ensemencement montre que pour :

- un tube contenant 5 cc. de sang + 1 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- le tube contenant 5 cc. de sang + 2 pour 500 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de colonies de staphylocoques.
- — 5 cc. de sang + 3 pour 500 d'acide borique : développement de 85 colonies de staphylocoques.
- — 5 cc. de sang + 4 pour 500 d'acide borique : développement de 150 colonies de staphylocoques, plus un bacille gram.
- — 5 cc. de sang + 1 pour 100 d'acide borique : développement d'un nombre incomptable de staphylocoques.

Les tubes témoins montrent une pullulation microbienne

abondante, puisque les ensemencements sur gélose donnent un développement de staphylocoques en colonies incompressibles.

En résumé, dans tous les essais l'acide borique répond aux conditions primordiales de la conservation d'un sérum, à savoir le respect de l'intégrité de ses propriétés physiques.

Aux doses de 1 pour 100 à 1 pour 500, comme les auteurs étrangers, nous avons été à même d'apprécier les qualités de l'acide borique, puisqu'il manifeste une innocuité complète vis-à-vis de la coloration et de la transparence du sérum. D'autre part, l'absence d'hémolyse, aussi bien que la fixité du titre du sérum, permettent l'emploi de l'acide borique en mélange avec le sang.

Mais en dernier lieu, l'examen des résultats obtenus lors de la recherche de ses propriétés antiseptiques montre que l'acide borique ralentit fort peu la culture des bactéries, et que des microbes survenant par pollution du milieu peuvent encore s'y développer.

La présence du bacille gram négatif trouvé dans deux de nos essais prouve en effet que l'acide borique est impuissant à entraver le repiquage de certaines bactéries. D'autant plus que les témoins dans la dernière expérience n'ayant pas montré de bacille gram négatif, il ne s'agissait pas d'infestation massive. L'acide borique n'est donc pas un bon agent de conservation.

Son emploi n'est à conseiller que pour la conservation d'un sang relativement court, 24 heures au maximum.

Action de l'acide citrique sur le sang ou ses constituants

L'acide citrique, que certains auteurs recommandent comme antiseptique, nous a paru pouvoir faire aussi l'objet d'essais ayant pour but de déterminer son activité et sa possibilité d'emploi pour la conservation du sang entier.

Connaissant les proportions assez fortes auxquelles il doit être utilisé pour se montrer actif, nous avons pensé faire nos recherches en additionnant le sang de 1 pour 100 à 1 pour 500 d'acide citrique, quantité proposée lors des essais concernant l'acide borique.

Cinq tubes contenant chacun 5 cc. de sang reçoivent l'acide citrique à la dose de 1 p. 100, 4 p. 500, 3 p. 500, 2 p. 500, 1 p. 500.

Un autre tube pris comme témoin ne contient que 5 cc. de sang.

Ces tubes, laissés au laboratoire, sont repris quelques heures après, et l'on voit que le tube contenant le sang normal (tube témoin) montre une coagulation complète de celui-ci. Le caillot nage au sein du sérum.

De même, le tube contenant le sang additionné de 1 p. 500 d'acide citrique présente une bonne coagulation et un sérum bien exsudé.

Tous les autres tubes contiennent un magma divisé en deux par une zone trouble.

Au fond du tube, un dépôt sur lequel surnage un liquide

jaune-rougeâtre, qui doit représenter un mélange de plasma et de sérum fortement hémolysé, renferme les globules rouges.

Cet essai, répété à plusieurs reprises, a toujours donné les mêmes résultats.

L'acide citrique altère donc profondément les propriétés physiques du sang, et par suite du sérum.

Toute recherche de microbes, ou à plus forte raison d'anticorps, devient par conséquent impossible après l'apport d'acide citrique. Ayant obtenu ces résultats, nous n'avons pas poussé plus loin l'expérimentation afin de connaître la valeur antiseptique de l'acide citrique, puisqu'il est impossible de l'employer pour la conservation du sang. Nous avons en effet mis en évidence ses propriétés néfastes sur la spécificité du sérum. L'acide citrique ne peut pas être retenu comme conservateur du sang.

Action de l'hyposulfite de soude sur le sang ou ses constituants

Dans une communication à l'Académie des Sciences, A. LUMIÈRE et CHEVROTIER écrivent que « l'hyposulfite de soude ne semble pas détruire ni même atténuer les propriétés des sérums antitoxiques, des expériences en cours ont pour objet de préciser l'influence d'un contact prolongé de ces corps dans le but de montrer qu'aucun inconvénient ne résulte de l'emploi de tels mélanges. »

Au cours de leurs recherches sur l'action thérapeutique de l'hyposulfite dans les maladies des animaux, L. PANISSET et Jean VERGE ont été conduits à examiner le point spécial sur lequel A. LUMIÈRE et CHEVROTIER attirent l'attention.

Le sérum utilisé dans les expériences est, non pas un sérum antitoxique, mais un sérum de lapin hémolytique pour les hématies de mouton, et l'on recherche l'action empêchante, ou tout simplement retardataire de l'hyposulfite de soude à des taux différents et dans des conditions variables, sur le phénomène de l'hémolyse.

Dans une première série de recherches, on emploie une dilution au titre de 1 p. 100 d'hyposulfite de soude dans l'eau distillée.

Après avoir mis en présence cette solution d'hyposulfite de soude et le sérum hémolytique, on fait trois parts du mélange : une était employée immédiatement pour rechercher

dans quelle mesure elle avait conservé ses propriétés hémolytiques, les deux autres étaient maintenues au contact durant 24 heures, soit à la température du laboratoire, soit à la température de l'étuve, et utilisées après ce délai pour déterminer leur activité. Tous les témoins nécessaires étaient réalisés dans chacun des essais.

A ce taux (1 p. 100) on n'observe aucun phénomène d'inhibition. L'hémolyse était aussi manifeste, aussi complète et aussi rapide avec les sérums hyposulfités que dans les tubes témoins. Peut-être y a-t-il lieu de noter seulement que l'hyposulfite de sodium exerce une légère action agglutinante sur les globules rouges de mouton, action qui s'accroît d'ailleurs avec la durée du contact.

Dans une deuxième série de recherches, on porte à 2 p. 100 le titre de la solution aqueuse de l'hyposulfite de soude. Les expériences faites selon les modalités indiquées n'ont donné aucun résultat en ce qui concerne le pouvoir inhibiteur du sel étudié.

Enfin, dans une troisième et dernière série d'expériences, le taux de la solution fut porté à 5 p. 100. malgré cela les résultats furent nuls, et l'hémolyse se produisit aussi parfaitement dans les tubes renfermant du sérum hyposulfité que dans les tubes témoins.

L'agglutination des hématies de mouton est d'autant plus manifeste que le titre de la solution d'hyposulfite est plus élevé.

En somme, l'hyposulfite de soude au taux de 1, 2 et 5 p. 100 n'exerce aucune action sur les anticorps spécifiques du sérum hémolytique. On n'obtient aucune action inhibitrice, ni même simplement retardatrice.

Conclusions

Les résultats des recherches que nous avons poursuivies sur la conservation des sérums destinés au séro-diagnostic établissent la possibilité d'ajouter au sang suspect, au moment de la récolte, diverses substances antiseptiques sans modifier la coagulabilité du sang, la rétraction du caillot, l'exsudation du sérum, l'obtention d'un sérum clair, limpide, non teinté par l'hémoglobine, indemne de contamination microbienne, ayant conservé toutes ses propriétés spécifiques, notamment celles qui sont mises en évidence par le séro-diagnostic.

Nous avons utilisé le formol, le quinosol (sulfate d'ortho-oxyquinoléine), la glycérine, l'acide borique, l'acide citrique, l'hyposulfite de soude.

Pour répondre à toutes ces conditions exigées d'un sérum destiné au séro-diagnostic, on s'inspirera des indications suivantes, déduites de nos expériences :

- 1) Le formol (formaldéhyde du commerce) doit être ajouté au sang dans une proportion qui varie de 5 pour 1000 à 8 pour 1000.
- 2) Le quinosol doit être ajouté au sang dans une proportion qui varie de 1 pour 1000 à 3 pour 1000.
- 3) La glycérine doit être ajoutée au sang dans une proportion qui varie de 10 pour 1000 à 20 pour 1000.
- 4) L'acide borique, possédant de faibles propriétés antisepti-

ques, ne pourra être utilisé que pour la conservation du sang durant 24 heures. L'acide borique doit être ajouté dans une proportion qui varie de 1 pour 100 à 1 pour 500.

- 5) L'acide citrique, altérant trop profondément les propriétés spécifiques du sérum, n'est pas à retenir comme conservateur du sang.
- 6) L'hyposulfite de soude ajouté dans une proportion de 1 pour 100 à 5 pour 100 n'exerce aucune action sur les anticorps spécifiques du sérum hémolytique.
- 7) Certaines de ces substances : le formol, le quinosol, la glycérine, employées aux doses que nous venons d'indiquer, permettent à la fois d'utiliser le sérum pour un but de séro-diagnostic et pour un but de recherches bactériologiques.

Vu le Doyen,

A. Roger

Vu le Président,

Lechien

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

CHARLÉTY.

Bibliographie

- Armand DELILLE et L. LAUNOY. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1911, page 222.
- A.-H. BAKER. A useful preservatrice for whole Blood (*The British journal of Experimental Pathology*, 26 juin 1925).
- BENARIO. — Noch einmal die Leucocytschatten (*Klein's Deutsche medizinische Wochenschrift*, 1894, page 572).
- BESSEMANS et LEYNEN. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 29 avril 1922, 24 juin 1922.
- J. BLUM. — Formol als Konservierungsmittel (*Vorläufige Mitteilung, Zoologischer Anzeiger*, 1893, n° 434).
- F. BLUM. — Formaldehyd als Hartungsmittel (*Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*, t. x 1893, p. 314).
- COMBIESCO. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 17 juin 1922.
- DUNGEN et COCA. — Berl. Klin. Woch., 7 janvier et 29 avril 1902.
- ENGEL. — Leitfaden zur Klinischen Untersuchung des Blutes, Berlin 1898.
- GATÉ et PAPACOSTAS. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 18 novembre 1920, 7 et 29 novembre 1921. — *La Clinique*, avril 1922, page 91.
- H. GROSS. — Die Konservierung hämolytischer Immunsera mit Chinosol *Centralblatt für Bakteriologie I Abt. orig.* Bd III, Heft 5, 8 mars 1929.

- GUYOT. — Centralblatt für Bakteriologie I Abt. orig. vl. 48, fasc. 3, 1909.
- KOLLE et WASSERMANN. — Konservierungszusätze, page 208.
- KALININ et GINSBURG. — Über das Konservieren hämolytischer Sera Zeitschrift für Immun. Forsch, 1927, T. 53, page 112.
- A. LUMIÈRE et CHEVROTIER. — Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 18 octobre 1920.
- G. MARCANO. — *Archives de Médecine expérimentale* 1899, page 434.
- MATTHES. — *Münch. med. Woch.*, 7 janvier et 29 avril 1902.
- NICOLAS. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 22 juillet 1922.
- E. NICOLAS et PANISSET. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 7 janvier 1922, 14 janvier 1922.
- DE OLIVIERA et J.-R. PEREZ. — Comptes rendus de la Société de Biologie, 21 janvier 1922.
- PERRIN et HANUS. — Méthode pratique d'appréciation de la coagulabilité du sang (Comptes rendus de la Société de Biologie, 28 novembre 1922).
- Ch. RICHET. — Coagulation du sang. *Dictionnaire de Physiologie*.
- STEWART. — *Journ. of physiol.* 1901, vol. 26, page 494. *The Journ. of. Pharmacol. and exp. therap.* 1909, n° 1, page 51.
- K.-L. WOLLERS. — Beitrag zur Serumkonservierung. Centralblatt für Bakteriologie I, Abt. orig. Bd III, Heft 6/8, 23 août 1929.
-

imprimerie « LES PRESSES MODERNES », 45 rue de Maubeuge, Paris
Ateliers à Troyes (Aube)
